

サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) の
食品機能性評価に関する研究

任 良 懋

論文目録

本学位論文は下記の原著論文を基に作成され、城西大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Im R., Mano H., Matsuura T., Nakatani S., Shimmizu J., and Wada M.(2008)
Mechanisms of blood glucose-lowering effect of aqueous extract from stems of Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) in the mouse. *J Ethnopharmacol* **121**, 234-240
2. Im R., Mano H., Nakatani S., Shimmizu J., and Wada M.(2008)
Safety evaluation of the aqueous extract Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) stems in the hepatic gene expression profile of normal mice using DNA microarrays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 70745-1-9
3. Im R., Mano H., Nakatani S., Shimmizu J., and Wada M.(2008)
Aqueous extract of Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) stems promotes oxygen consumption and suppresses body fat accumulation in mice. *J Health Sci* **54**, 645-653

目次

総論の部

緒言	1
第1章 マウス肝臓の糖代謝関連遺伝子の遺伝子発現量に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響	6
第1節 2型糖尿病モデルマウスの空腹時血糖値に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響	6
第2節 2型糖尿病モデルマウスの肝臓の遺伝子発現量に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響	9
第3節 糖新生律速酵素の遺伝子発現量に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響	13
第4節 本章の小括および考察	14
第2章 サラシア幹熱水抽出液による FBP 遺伝子発現量の調節機構ならびにサラシア幹熱水抽出液中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討	16
第1節 サラシア幹熱水抽出液による FBP 遺伝子発現量の調節機構に関する検討	16
第2節 マウス培養肝細胞株における空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討	18
第3節 2型糖尿病モデルマウスにおける空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討	21
第4節 本章の小括および考察	23

第3章 高脂肪食を摂取させたマウスの酸素摂取量(VO ₂ , oxygen consumption) ならびに脂肪組織に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響	26
第1節 マウスの酸素摂取量ならびに呼吸商に及ぼすサラシア幹部熱水抽出液の影響	26
第2節 マウスの脂肪組織に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響	31
第3節 本章の小括および考察	33
第4章 DNA マイクロアレイを用いたサラシア幹熱水抽出液のゲノミクス (genomics) 食品安全性評価	38
第1節 マウスの耐糖能におよぼすサラシア幹熱水抽出液の影響	38
第2節 DNA マイクロアレイを用いたサラシア幹熱水抽出液のゲノミクス (genomics) 食品安全性評価	40
第3節 本章の小括および考察	47
総括	50
謝辞	53
実験の部	54
引用文献	71

本論文で使用した略語一覧

Act D ; アクチノマイシン D

AST ; アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

ALT ; アラニンアミノトランスフェラーゼ

CHX ; シクロヘキシミド

CYP ; チトクローム P 450

DNJ ; 1-deoxynojirimycin

EC ; (-)-epicatechin

EG ; (-)-epigallocatechin

FBP ; fructose-1,6-bisphosphatase

GAPDH ; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

G6P ; glucose-6-phosphatase

GST ; glutathione S-transferase

KW ; 桑茶抽出液

MG ; mangiferin

MF ; 塩酸メトホルミン

NEFA ; nonesterified fatty acid

OGTT ; Oral Glucose Tolerance Test

PPAR ; peroxisome proliferator-activated receptor

RT-PCR ; Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

RQ ; respiratory quotient

RXR ; retinoid X receptor

SRE ; サラシア・レティキュラータ幹熱水抽出液

SRED ; サラシア・レティキュラータ幹熱水抽出液凍結乾燥物

TZDs ; チアゾリジンジオンズ

UCP ; uncoupling protein

VO₂ ; oxygen consumption

総論の部

緒 言

肥満やインスリン抵抗性はメタボリックシンドロームを惹起し、糖尿病や血管疾患（心筋梗塞、脳梗塞）の主要な原因となっており、肥満やインスリン抵抗性の予防法や治療法の確立は糖尿病や血管疾患などの生活習慣病予防のためにきわめて重要である[1]。近年日本では、生活様式の変化と食生活の欧米化により疾病構造が大きく変化し、悪性新生物、心疾患、脳血管疾患などの生活習慣病が死亡順位の上位を占めている[2]。生活習慣病の中で特に糖尿病罹患率の増加は著しく、平成 18 年国民健康・栄養調査の結果、糖尿病が強く疑われる人は約 820 万人、糖尿病の可能性が否定できない人は約 1050 万人と推定されている。また、40～74 歳では男性の 2 人に 1 人、女性の 5 人に 1 人が、メタボリックシンドロームが強く疑われる者、又は予備群と推定されている[3]。糖尿病は、合併症として、網膜症や腎症、神経障害などの重篤な障害が知られており、動脈硬化や心筋梗塞などのリスクファクターでもある[4]。糖尿病は 1 型と 2 型に分類される。1 型糖尿病は、膵β細胞の破壊性病変に起因するインスリンの絶対的欠乏によって発症する[5]。一方 2 型糖尿病は、遺伝要因に生活習慣要因などが加わりインスリン抵抗性が主な原因で発症し、糖尿病患者の 90～95%は 2 型糖尿病だと推定されている[6,1]。2 型糖尿病の発症には、肝臓・筋肉・脂肪組織などの複数の臓器が関与しているといわれ [6]、インスリン抵抗性に起因する糖・脂質代謝異常により、血中のグルコース濃度上昇が引き起こされる[7]。糖尿病は臓器間の相互作用が複雑なため新薬の開発においては標的臓器の特定が最も重要な課題である[4]。肝臓はインスリンの最も重要な標的臓器の一つであり、肝臓の糖代謝制御にかかわる分子はインスリン抵抗性の薬理的治療の標的となる。肝臓は体内の糖・脂質代謝において中心的な機能を果たし、特に肝臓での糖新生の亢進は血中グルコース濃度を著しく上昇させ糖

尿病の病態を悪化させるといわれている。

インスリンの投与を必要としない2型糖尿病の経口治療薬としては、グルコースの吸収を抑える α -グルコシダーゼ阻害剤、膵臓のインスリン分泌を促進する分泌促進剤、筋肉組織を標的にしたインスリン抵抗性改善剤、肝臓に作用する糖新生阻害剤の主に4種類が開発されてきた。今後の治療薬の展望としては、肥満を予防し膵 β 細胞の負担を軽減し、メタボリックシンドロームの段階で糖尿病を予防できることが望ましいと考えられる。

サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*、以下 サラシアと記す) は、スリランカに自生するデチンムル科 (Hippocrateaceae) に属するツル性樹木で、現地ではシンハラ語の“Kothala himbutu”という通名で知られている。サラシアの根皮は、古来よりインド・スリランカの伝承医学アユルベーダにおいて、糖尿病、炎症、皮膚疾患、潰瘍、肝炎などの治療に用いられてきた[10]。現在もスリランカの市場ではサラシアを配合したハーブティーなどが売られており、糖尿病の予防と治療を目的として臨床現場や民間療法として用いられている[11]。また、日本や米国などの先進諸国でサラシアは健康増進を目的としたサプリメントとしても広く普及している。

食品には栄養面での機能（一次機能）、嗜好面での機能（二次機能）に加え生体調節機能（三次機能）があるとされており、食品の三次機能を中心とした研究において1984年に機能性食品のコンセプトが提唱され、1993年には世界に発信された[8]。平成3年(1991)年には「特定保健用食品」の制度が設けられ、平成13年に創設された「保健機能食品制度」における「特定保健用食品」の新たな枠組みにより、機能性食品への消費者の関心とニーズはより高いものとなっている[9]。

機能性食品は、食経験などにより重篤な副作用が起こりにくいと考えられ、有効性や生理作用が経験的に知られており、安価であるという利点がある。特に、2型糖尿病や生活習慣病などの治療においては、食事療法と薬物治療に加えて機能性食品をうまく組み合わせることは有効であると考えられる (Fig. 1)。

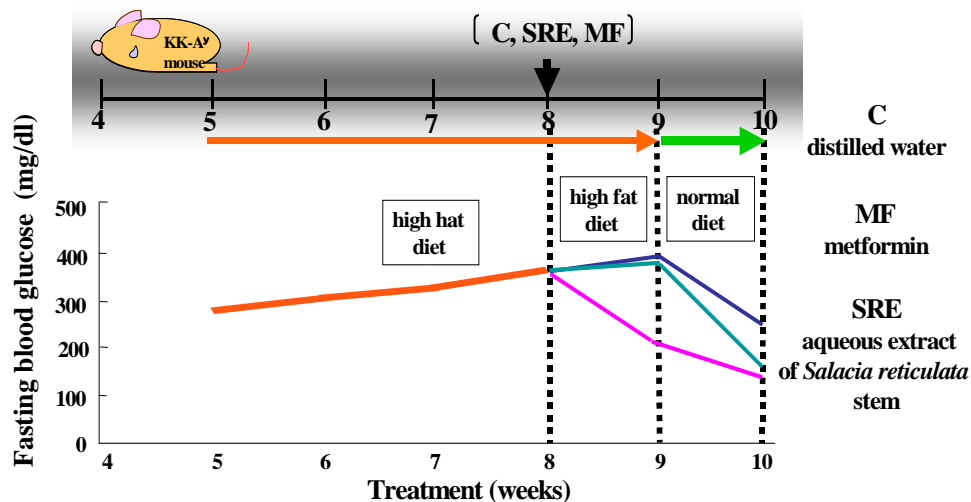


Figure 1. The combination of diet and medicine, or diet and functional food improved elevation of fasting blood glucose level induced by high fat diet in KK-Ay mice.

食品機能性評価は機能性食品の科学的根拠（エビデンス）を明らかにすることが目的である。機能性食品の科学的根拠としては、ヒトでの効果とメカニズムの解明が必要である。近年、栄養学研究の分野で、遺伝子工学的手法を用いて生体内のメカニズムを解明するニュートリゲノミクスが着目されている。高等真核生物の細胞には数万の遺伝子が存在し、それぞれ調和のとれた制御を受け必要に応じて発現している。遺伝子発現パターンは健康状態や疾病罹患状態によって異なり、細胞内では必要とされるタンパク質量に従って転写量が効率的に制御されている。食品を摂取すると遺伝子発現パターンが変化し、代謝調節機構に影響を及ぼす。従って、遺伝子発現量の検討は、機能性食品のメカニズムを解明する上で重要な指標の一つになると考えられる。本研究では、サラシアの機能性食品としての科学的根拠を明らかにするために、DNA マイクロアレイ解析法などの遺伝子工学的手法を用いてメカニズムの解明を行った。

サラシアによる血糖値調節作用のエビデンスについては、サラシア根皮及び幹部の熱水抽出液がラット及びヒトの食後血糖値の上昇を抑制するという報告があり、その作用機構として腸管での α -グルコシダーゼ活性阻害による炭水化物の消化吸收抑制作用が明らかとなっている[12,13]。サラシアの有効成分としては、メタノール抽出物の水溶性画分より α -グルコシダーゼ阻害作用を有する、新規化合物であるサラシノール、コタラノールなどが単離同定されている[14、15]。一方、サラシア根皮及び幹の熱水抽出液がラットおよび軽症2型糖尿病患者において空腹時血糖値を降下させるという報告がある[16, 17]。しかし、サラシアによる空腹時血糖値降下作用は、比較的速効的且つ長時間に及ぶため、 α -グルコシダーゼ阻害作用だけでは説明できない。

空腹時血糖値は、基礎インスリン分泌により制御された肝臓からのグルコース放出率と、全身、特に筋・脂肪組織でのグルコース取り込み率が一致して正常に保たれている。2型糖尿病では、インスリン抵抗性により、肝臓からのグルコース放出率が上昇し、全身のグルコース取り込み率が増加しないことから高血糖となっている[4]。空腹時血糖値の調節には肝臓の糖代謝が主に関与していると考えられる。摂食を介して肝臓に取り込まれたグルコースは、嫌氣的条件下での解糖と、好氣的条件下でのTCA回路を経て代謝される。また、肝臓に取り込まれたグルコースの一部はグリコーゲンとして貯えられる。一方、絶食時は解糖が抑制され、グリコーゲンの分解と糖新生の促進により肝臓からグルコースが血中に放出される[1]。肝臓の糖代謝はglucokinase、phosphofructokinase、glycogen synthase、fructose-1,6-bisphosphatase (FBP) [18]、glucose-6-phosphatase (G6P) [19]、phosphoenolpyruvate carboxylkinase (PEPCK) [20]、pyruvate carboxylase (PC) [21]などの多くの律速酵素群によって制御され、血糖値の維持に寄与している。代謝調節機構を検討する方法としては、酵素活性の測定、その前段階でのタンパク質の分泌や修飾、そして酵素遺伝子の遺伝子発現量の検討などが挙げられる。近年、遺伝子発現調節におけるmRNA量の測定は、RT - PCR法 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

[22] やDNAマイクロアレイ解析法[23] などの進歩により、簡便に、有用な情報が得られるようになった。特に、DNAマイクロアレイ解析は、1 枚のマイクロアレイチップに数千から数万種類の遺伝子情報が搭載されているため、1 回の解析で遺伝子発現パターンの網羅的解析が可能であることから、食品の未知機能の評価や食毒性評価などが可能だと考えられる。

本研究では、サラシアの食品機能性評価を目的に実験を行った。すなわち、サラシアの科学的根拠を明らかにするために、DNA マイクロアレイ解析法やRT-PCR 法などの遺伝子工学的手法を用いてメカニズムの解明を行った。メカニズムの解明としてはまず、サラシアによる血糖値調節機構を解析するために、マウス肝臓の遺伝子発現量に及ぼすサラシアの影響を解析し、*in vitro* でサラシアによる遺伝子発現量の調節機構を検討した。また、*in vitro* および *in vivo* でサラシア中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討を行い、空腹時に肝臓から放出が抑制された糖の代謝経路を明らかにするために、*in vivo* で酸素消費量 (VO₂, oxygen consumption) および呼吸商 (RQ, respiratory quotient) を解析した。さらに、サラシアによる内臓脂肪蓄積抑制作用のメカニズムを解析するために、脂肪組織に及ぼすサラシアの影響を検討した。加えて、機能性食品としてのサラシアの安全性を評価するために、マウス肝臓の遺伝子発現量に及ぼす影響を検討し、サラシアのゲノミクス (genomics) 食品安全性評価とした。

第1章 マウス肝臓の糖代謝関連遺伝子の遺伝子発現量に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*、以下 サラシア) の樹皮や根皮は、糖尿病患者の血糖値を降下させ、口渇をいやすことが経験的に知られており、糖尿病患者に対する民間療法として利用されてきた歴史がある。サラシアによる食後血糖値調節作用のメカニズムとして腸管での α -グルコシダーゼ阻害作用が明らかとなっている。一方で、サラシア根皮及び幹の熱水抽出液がラットおよび2型糖尿病患者において空腹時血糖値を降下させるという報告がある[16, 17]が、その作用機構は不明である。

本章では、サラシアによる血糖値調節機構を解明するために、2型糖尿病モデルマウスである KK-Ay マウス[24]を用いて、サラシア幹部熱水抽出液 (SRE) による空腹時血糖値降下作用を確認後、DNA マイクロアレイを用いて肝臓の遺伝子発現量に及ぼす SRE の影響を解析した。また、DNA マイクロアレイ解析の結果を基に、変動した遺伝子の mRNA 量を RT-PCR 法で測定した[25]。

第1節 2型糖尿病モデルマウスの空腹時血糖値に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

本研究に用いたサラシアの幹は、スリランカ産業技術研究所ハーブ技術部門 (Colombo, Sri Lanka) G.A.S. Premakumara 博士が鑑定を行った。サラシアの幹粉碎物 12g を純水 1.5 L を用いて 2 時間煮沸し、温時濾別後、遠心分離により得られた上清を、サラシア幹熱水抽出液 (SRE) とした。SRE を凍結乾燥して得られた凍結乾燥物を、サラシア幹熱水抽出液凍結乾燥物 (SRED) とした。1 ml の SRE からは約 0.45 mg の SRED 得られた。

4 週令の雄性 KK-Ay マウスを購入し 1 週間の予備飼育後に、糖尿病の発症を促す目的

で高脂肪飼料（クイックファット 日本クレア；脂質重量比＝15.3%、脂質エネルギー比＝32.3%、425kcal/100g）を摂取させた。先ず、糖尿病初期での SRE 投与を想定して 5 週令からの 4 週間、SRE (SRED 0.45 mg/ml) を飲水として投与した。マウスの 1 日の飲水量は約 10 ml (SRED として約 4.5 mg) であった。対照としては桑茶抽出液 (KW) を、コントロールとしては純水 (C) を投与した。KW 中には、腸管での α -グルコシダーゼ阻害作用を有する 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) という化合物が明らかとなっており、ラットやヒトにおける試験において食後の血糖値上昇を抑制することが報告されている [26, 27]。

実験飼育期間、各群の飼料摂取量および体重増加量に有意差はなかった (data not shown)。投与開始後 1 週間目と 2 週間目に空腹時血糖値を測定した。空腹時血糖値の測定は、10 時間の絶食後に尾静脈より血液を採取し、簡易測定器グルコカードダイアメーター（アークレイ株式会社製） [28] を用いて行った。

Table 1. Effects of SRE and KW on fasting blood glucose levels in KK-Ay mice.

	Blood glucose level (mg/dl)	
	1	2 (weeks)
C	285 \pm 61.1	400 \pm 73.3
SRE	154 \pm 14.3 *	239 \pm 77.5 *
KW	269 \pm 122	342 \pm 22.9

C, control (distilled water); SRE, aqueous extract of *Salacia reticulata* stem; KW, aqueous extract of Kuwa tea. Data are means \pm SD; $n=5$ in each group. * <0.05 vs. the control group.

空腹時血糖値の測定結果を Table 1 に示した。投与開始後 1 週間目と 2 週間目の KW 群の空腹時血糖値はコントロールに比べ降下傾向を示したが、有意差はなかった。一方、SRE 群の空腹時血糖値はコントロールに比べ、投与開始後 1 週間目では約 1/2 に、2 週間目で

は約 2/3 に低下していた。(Table 1)。このことから、SRE は KK-Ay マウスにおいて空腹時血糖値降下作用を有しており、その作用機構として α -グルコシダーゼ阻害作用以外の可能性が考えられた。

次に、糖尿病後期での SRE 投与を想定して 8 週令からの 4 週間 SRE を飲水として投与した。対照としては、KW、ビグアナイド系の糖尿病治療薬である塩酸メトホルミン (MF)、コントロールとしては純水 (C) を投与した。MF は肝臓での糖新生抑制作用などにより、インスリンの分泌を促進することなく血糖値を調節するといわれており [29]、欧米の臨床現場では第 1 選択薬として、SU 剤と併用また単用で広くに用いられている [30]。投与期間、各群の飼料摂取量および体重増加量に有意差はなかった (data not shown)。投与開始後 1 週間目と 3 週間目に空腹時血糖値を測定した。空腹時血糖値の測定結果を Table 2 に示した。

Table 2. Effects of SRE, KW and MF on fasting blood glucose levels in KK-Ay mice.

	Blood glucose (mg/dl)	
	1	3 (weeks)
C	451 \pm 70.5	355 \pm 72.1
SRE	221 \pm 75.7 *	274 \pm 77.0
KW	413 \pm 72.7	319 \pm 40.2
MF	412 \pm 87.4	288 \pm 87.6

C, control (distilled water); SRE, aqueous extract of *Salacia reticulata* stem; KW, aqueous extract of Kuwa tea; MF, Metformin. Data are means \pm SD; $n = 5$ in each group. * $P < 0.05$ vs. the control group.

投与開始後 1 週間目の空腹時血糖値は、KW 群と MF 群が C 群に比べ降下傾向を示したが、有意差はなかった。一方、SRE はコントロールに比べ空腹時血糖値を約 1/2 に低下させた。投与開始後 3 週間目の空腹時血糖値は、SRE 群と MF 群が C 群に比べ約 3/4

に低下したが、有意差はなかった。これは、糖尿病の悪化により SRE による空腹時血糖値低下作用が減弱されたものと考えられた。また、SRE による空腹時血糖値低下作用は、投与開始後 1 週間で顕著に現れることが確認できた。

第2節 2 型糖尿病モデルマウスの肝臓の遺伝子発現量に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

SRE の投与は、2 型糖尿病モデルマウスの空腹時血糖値を有意に低下させた。次に、DNA マイクロアレイを用いて 2 型糖尿病モデルマウスの肝臓の遺伝子発現量に及ぼす SRE の影響を解析した。SRE を飲水として 4 週間投与した後 (SRED として約 126 mg)、肝臓を採取し、total RNA を抽出した。SRE とコントロール (純水投与) 各々 6 匹分の total RNA を混和し、DNA マイクロアレイ解析に供した。

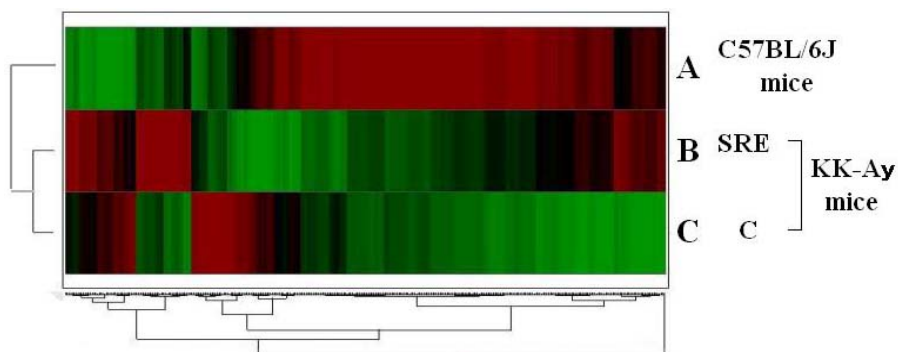


Figure 2. Hierarchical clustering analysis of hepatic gene expression. All experiments and analyses were performed according to protocol for GeneChip microarray analysis system (Affymetrix). Red color represents expression level above mean expression of a gene across all sample, black color represents mean expression, and green color represents expression lower than the mean. A: the gene expression of C57BL/6J mice treated with distilled water. B: the gene expression of KK-Ay mice treated with SRE (SRE). C: the gene expression of KK-Ay mice treated with distilled water (C).

DNA マイクロアレイはAffymetrix 社の GeneChip を用いた。「Affymetrix Microarray Suite 5.0」を用いた解析の後、「SpotFire DecisionSite7.1 Function Genome Programme」を用いて「Hierarchical clustering」[31] 解析を行った。「Hierarchical clustering」解析の結果を Fig. 2 に示した。赤色は発現強度が 2 倍以上の遺伝子を、緑色は発現強度が 1/2 倍以下の遺伝子を、黒色はその中間を現している。A は 5 週齢からの 4 週間、純水を飲水として投与した C57BL/6J マウスの肝臓の遺伝子である。飼料は実験動物用固形飼料 MF を自由摂取させた。B、C は 8 週齢からの 4 週間、高脂肪食を自由摂取させた KK-A^y マウスの肝臓の遺伝子である。B は SRE を、C は純水を飲水として各々投与した。B と C の遺伝子発現パターンは顕著に異なっており、SRE の投与はコントロールに比べ多くの遺伝子の遺伝子発現量を増減させた。また、B の遺伝子発現パターンは C に比べ、A の遺伝子発現パターンに近かった (Fig. 2)。

Table 3. Number of genes whose expressions were up- or down-regulated compared with control at least 2-fold in the liver of mouse treated with SRE.

DNA マイクロアレイ解析の結果、検出された遺伝子は、	Genes (12490)	SRE
12490 個であった。SRE の投与によりコントロールに比べ遺伝子発現強度が 2 倍以上の遺伝子は 1008 個、1/2 倍以下の遺伝子は 1331 個であった。「Stress」	Up-regulated	1008
(69)、「Energy」(118)、「Transcription」(1536)、「Inflammatory」(92)、「Cell cycle」(490)、「Ribosomal」(178)のカテゴリーに分類して、変動した遺伝子の数を Table 3 に示	Down-regulated	1331
	Stress (69)	
	Up-regulated	8
	Down-regulated	2
	Energy (118)	
	Up-regulated	7
	Down-regulated	9
	Transcription (1536)	
	Up-regulated	118
	Down-regulated	165
	Inflammatory (92)	
	Up-regulated	18
	Down-regulated	12
	Cell cycle (490)	
	Up-regulated	43
	Down-regulated	54
	Ribosomal (178)	
	Up-regulated	7
	Down-regulated	8

The gene expression in the liver of mice administered the aqueous extrants of *Salacia reticulata* (SRE) compared with that in control mice that drank only distilled water.

した。

本研究ではエネルギー代謝に着目し、特に糖代謝に関与する遺伝子について詳細に検討した。肝臓の糖代謝に関与する遺伝子の解析結果を Table 4 に示した。SRE はマウス肝臓の糖代謝に関与する遺伝子の中で、糖新生、解糖系、TCA 回路に関与する遺伝子の遺伝子発現量に影響を及ぼした。「glycolysis」では「glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (M32599_M_st)」と「phosphoglycerate mutase」が 1/2 倍以下、「glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble」が 2 倍以上変動していた。「TCA-cycle」では「pyruvate dehydrogenase kinase-like protein」が 2 倍 以上変動していた。特に、SRE は糖新生の律速酵素である fructose-1,6-bisphosphatase (FBP) と glucose-6-phosphatase (G6P) の遺伝子発現量を約 1/2 に減少させた (Table 4)。このことから、FBP と G6P に着目して以後の実験を行うこととした。

Table 4. Gene expression of the hepatic glucose metabolism in KK-Ay mice liver treated with SRE.

Affymetrix ID	Gene (Descriptions)	SRE/Control Ratio
gluconeogenesis		
97379_at	fructose 1,6-bisphosphatase	0.62
103333_at	glucose-6-phosphatase	0.54
160481_at	phosphoenolpyruvate carboxykinase	1.30
gluconeogenesis, glycolysis and TCA cycle		
L09192_s_at	pyruvate carboxylase	0.90
L09192_MA_at	pyruvate carboxylase	0.84
L09192_MB_at	pyruvate carboxylase	0.98
L09192_3_at	pyruvate carboxylase	0.95
93308_s_at	pyruvate carboxylase homologous protein	0.98
glycolysis		
160090_f_at	aldolase A	1.12
96344_at	beta-enolase	0.84
M32599_5_st	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.72
M32599_M_st	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.50
M32599_3_st	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.10
101214_f_at	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.95
100574_f_at	glucose phosphate isomerase 1 complex	0.96
100573_f_at	neuroleukin	0.96
101990_at	lactate dehydrogenase 2, B chain	0.74
92637_at	phosphofructokinase, B-type	1.06
93346_at	chromosome-linked phosphoglycerate kinase	0.93
99566_at	triosephosphate isomerase	0.93
102651_at	glucokinase activity	1.00
93489_at	glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble	1.12
93355_at	aspartate aminotransferase precursor	3.07
99335_at	hexokinase I	0.99
96072_at	lactate dehydrogenase A-4	0.96
96066_s_at	pyruvate kinase 3	1.45
93103_at	lactate dehydrogenase 3, C chain	0.86
101471_at	pyruvate kinase	0.77
94375_at	hexokinase II	0.57
92599_at	phosphoglycerate mutase	0.30
101388_at	phosphoglycerate kinase 2	0.07
glycolysis and TCA cycle		
97502_at	dihydroliipoamide dehydrogenase	1.12
93991_at	malate dehydrogenase, mitochondrial	1.01
97508_at	malate dehydrogenase, soluble	0.88
98102_at	pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit	1.05
99542_at	pyruvate dehydrogenase E1alpha-like	0.63
TCA-cycle		
93029_at	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+), gamma	0.77
93501_f_at	ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit	1.16
93502_r_at	ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit	1.52
160428_at	GTP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit	1.10
102049_at	pyruvate dehydrogenase kinase-like protein	2.21
95693_at	isocitrate dehydrogenase 2	1.10
glycogen metabolism		
98993_at	protein phosphatase 2A B alpha3	0.89
92519_at	glycogen synthase	1.07
97094_at	phosphorylase kinase gamma	0.89
101101_at	phosphatase 2A catalytic subunit, isotype beta	0.99
98496_at	phosphorylase kinase alpha 1	0.81

第3節 糖新生律速酵素の遺伝子発現量に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

SRE は DNA マイクロアレイ解析の結果、糖新生律速酵素である FBP と G6P の遺伝子発現量を約 1/2 に減少させた。次に、糖新生律速酵素の遺伝子発現量に及ぼす影響を RT-PCR 法で測定した。KK-Ay マウスに SRE を飲水として 4 週間投与した後、肝臓の total RNA を抽出し、RT-PCR 法に供した。コントロールとしては、純水を飲水として投与した。

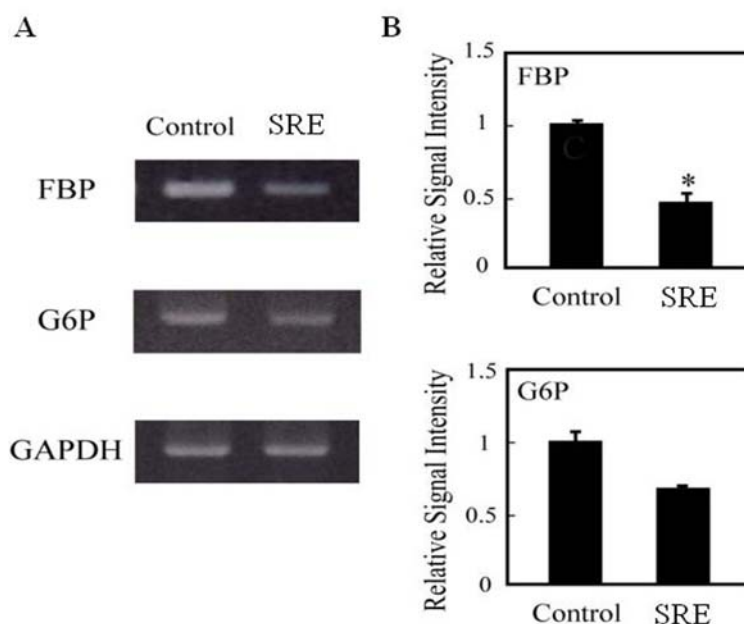


Figure 3. RT-PCR analysis of liver FBP and G6P from KK-Ay mice treated with an aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE) stem or distilled water (Control). Mice were treated with SRE for 4 weeks, and total RNA samples were processed for reverse transcription. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide (A). The mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA level in each sample (B). Results represent means \pm SD derived from 3 independent experiments, each experiment carried out in 6 mice. Photographs show the typical data of these experiments. * $P < 0.05$ vs. Control.

RT-PCR 法の結果、SRE は phosphoenolpyruvate carbxykinase (PEPCK) と pyruvate carboxylase (PC) の mRNA 量には影響を及ぼさなかった (data not shown)。一方 SRE は、FBP mRNA 量をコントロールに比べ約 1/2 に、G6P mRNA 量をコントロールに比べ約 2/3 に減少させた (Fig. 4)。SRE の投与は、KK-Ay マウスにおいて、DNA マイクロアレイ解析法と RT-PCR 法の二つの方法で FBP mRNA 量を有意に減少させた。このことから、先ず FBP に着目して今後の実験を行うこととした。

第4節 本章の小括および考察

本章では、サラシアによる血糖値調節機構を解析するために、2 型糖尿病モデルマウスを用いて、SRE による空腹時血糖値降下作用を確認後、肝臓の遺伝子発現量に及ぼす SRE の影響を検討した。

SRE は対照として用いた桑茶抽出液 (KW) に比べ空腹時血糖値を有意に降下させた。KW 中には、腸管での α -グルコシダーゼ阻害作用を有する化合物である DNJ が含まれており、食後の血糖値上昇を抑制することが報告されている[26, 27]。しかし、本実験の結果、KW は顕著な空腹時血糖値降下作用を示さなかった。サラシアのメタノール抽出物の水溶性画分からはチオ糖骨格を有する α -グルコシダーゼ阻害成分であるサラシノール、コタラノールが同定されている[14, 15]。SRE による空腹時血糖値降下作用は顕著であったが、その作用機構としては、 α -グルコシダーゼ阻害作用以外の可能性が考えられた。

DNA マイクロアレイ解析の結果を基に「Hierarchical clustering」解析を行った結果、KK-Ay マウスにおいて SRE 投与による遺伝子発現パターンは、コントロール (純水投与) の遺伝子発現パターンとは顕著に異なっていた。このことから、SRE は KK-Ay マウスの肝臓の遺伝子発現量に影響を及ぼすことが考えられた。

DNA マイクロアレイ解析において、SRE は肝臓の糖代謝に関与する遺伝子の遺伝子発

現量に影響を与えた。SRE は糖新生、解糖、TCA サイクルに関与する遺伝子の遺伝子発現量に影響を与えた。特に SRE は、糖新生の律速酵素である FBP と G6P の遺伝子発現量を約 1/2 に減少させた。RT-PCT 法の結果、SRE は G6P mRNA 量を約 2/3 に、FBP mRNA 量を約 1/2 に減少させた。

本章の結果、SRE は DNA マイクロアレイ解析において、KK-A_y マウスの肝臓の遺伝子発現パターンに影響を及ぼし、特に糖新生律速酵素である G6P と FBP の遺伝子発現量を減少させた。さらに SRE は DNA マイクロアレイ解析法と RT-PCR 法の二つの解析方法で FBP 遺伝子発現量を減少させた。このことから、SRE は糖新生の律速酵素である FBP の遺伝子発現調節を介して糖新生を抑制し、空腹時血糖値を低下させる可能性があると考えた (Fig. 4)。SRE の血糖値調節機構を解析するための重要な遺伝子として FBP が考えられたことから、先ず FBP 遺伝子発現量を指標に以後の実験を行うこととした。

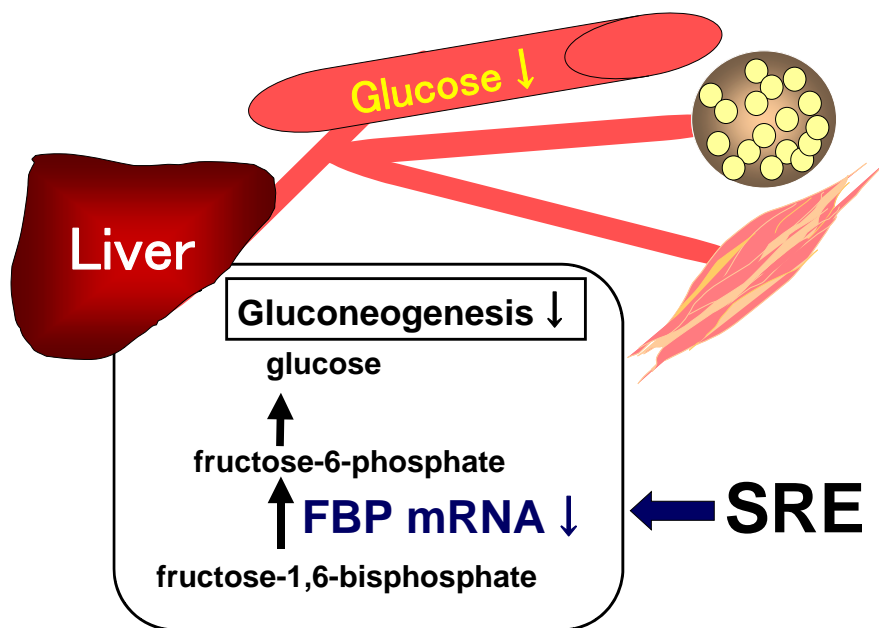


Figure 4. SRE down regulates the mRNA of FBP which is rate-limiting gluconeogenic enzyme in the mice liver.

第2章 サラシア幹熱水抽出液による FBP 遺伝子発現量の調節機構ならびにサラシア幹熱水抽出液中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討

SREは2型糖尿病モデルマウスであるKK-A_yマウスの空腹時血糖値を有意に降下させ、その作用機構として α -グルコシダーゼ阻害作用以外の可能性が考えられた。DNA マイクロアレイ解析法と RT-PCR 法の結果、SREは糖新生の律速酵素であるFBPの遺伝子発現量を減少させた。

本章では、SREによる血糖値調節機構を解析するために、SREによるFBP遺伝子発現量の調節機構の解明と、SRE中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討を行った[25]。実験は、*in vitro*および*in vivo*で行った。*in vitro*の実験は、マウス培養肝細胞株であるIMH2 [32]を用いた。*in vivo*の実験は、2型糖尿病モデルマウスであるKK-A_yマウスを用いた。

第1節 サラシア幹熱水抽出液による FBP 遺伝子発現量の調節機構に関する検討

SREは*in vivo*において、FBP mRNA量を有意に減少させたことから、マウス培養肝細胞株IMH2を用いてSREによるFBP遺伝子発現量の調節機構を検討した。*in vitro*の実験には、SREを凍結乾燥して得られた凍結乾燥物SRED (SRED 0.45 mg/SRE 1ml)をdimethyl sulphoxide (DMSO)に溶解後、0.20 μ m径フィルターで濾過滅菌を施したSRED溶液を用いた。

まず、SREDを終濃度0.1、1、10、25 μ g/mlで細胞に作用させ培養後、細胞増殖試験(MTTアッセイ)により細胞に作用させるSREDの最適濃度を検討した(Fig. 5)。インキュベートは33°Cで行った。終濃度10 μ g/ml以上では細胞増殖が抑制されていたことか

ら、細胞に作用させる SRED の終濃度を $1\mu\text{g/ml}$ と設定して以後の実験を行った。

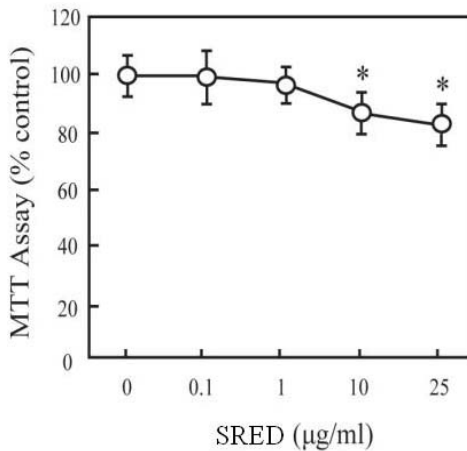


Figure 5. Freeze-dried aqueous extract from the *Salacia reticulata* (SRED) stem reduces the growth rate of IMH2 cells, as determined by the MTT assay. IMH2 cells were cultured in ASF medium containing various concentrations of SRED. SRED does not significantly alter the viability of IMH2 cells until reaching a concentration of $1\mu\text{g/ml}$. * $P < 0.05$ vs. vehicle-treated cells.

次に、SRED を終濃度 $1\mu\text{g/ml}$ で IMH2 に作用させ、4h、 37°C でインキュベートした後、RT-PCR 法で FBP mRNA 量を測定した。その結果、SRED はコントロール（溶媒のみ）に比べ FBP mRNA 量を約 1/2 に減少させた (Fig. 6)。

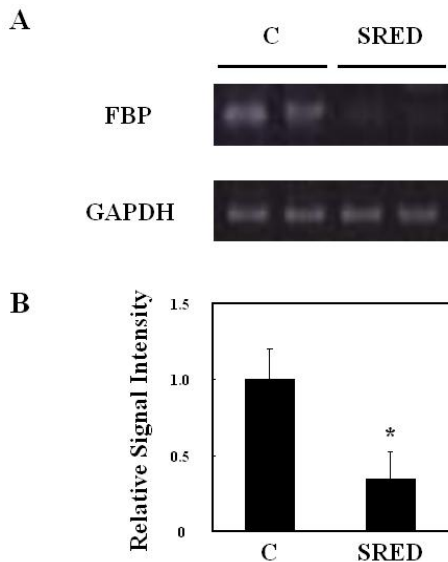


Figure 6. Effects of SRED on FBP mRNA level in IMH2 cells. RT-PCR analysis of FBP from IMH2 cells treated with SRED (SRED) or the DMSO (Control). The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide(A). mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA level in each sample (B). Results represent means \pm SD derived from three independent experiments, each experiment carried out in culture wells or dishes. Photographs show a typical data of these experiments. * $P < 0.05$ vs. Control.

SRED が IMH2 において FBP mRNA 量を有意に減少させたことから、この実験系を用いて FBP 遺伝子発現量の調節機構を検討することとした。

SRE が FBP mRNA の転写調節に関与するか、または転写後調節に関与するかを明らかにするために、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D (Act D) とタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を用いて検討した。Act D は SRED とともに FBP mRNA 量を減少させ、その一方で CHX は SRED による FBP mRNA 量の減少作用を抑制した (Fig. 7)。これにより、SRE が IMH2 において、FBP mRNA の不安定化 (分解) を促進している可能性が高いと考えた。

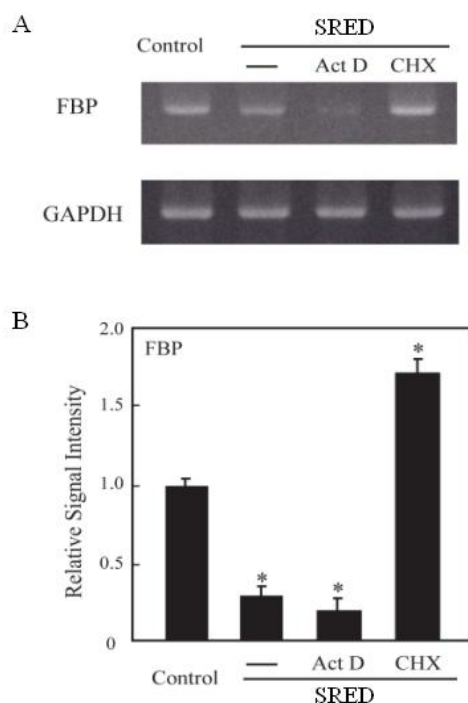


Figure 7. Cell viability destabilization of FBP mRNA in SRED-treated IMH2 cells. IMH2 cells were pre-treated with actinomycin D (Act D, 2.5 μ g/ml) or cycloheximide (CHX, 5 μ g/ml) for 1 h, then subsequently treated for 4 h with SRED (final concentration of 1 μ g/ml). Cells were also cultured with vehicle only (Control) or treated with SRED only. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide (A). The FBP mRNA levels were normalized to the GAPDH mRNA level in each sample (B). Results represent means \pm SD derived from 3 independent experiments, each experiment carried out in 4 culture dishes. * P < 0.05 vs. vehicle-treated cells.

第2節 マウス培養肝細胞株における空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討

in vitro において、SRED はマウス培養肝細胞に作用後 4 時間で FBP 遺伝子発現量を減

少させ、その作用機構として SRED が FBP mRNA の不安定化（分解を）促進している可能性が高いと考えた。次に、FBP 遺伝子発現量を指標に SRE 中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討を行った。

サラシア中に含まれる α -グルコシダーゼ阻害活性を有する有効成分として既に、salacinol, kotalanol が同定されている。一方、サラシア幹部の内樹皮や年輪状組織からは、他の実験報告において多くのポリフェノール類が抽出されている [33]。その中でも (-)-epicatechin (EC)、(-)-epigallocatechin (EG)、mangiferin (MG) はその含有量が多いことから有効成分の可能性が指摘されている。MG は *in vitro* で α -グルコシダーゼ阻害活性を有することが報告されており [33]、古来より血糖値調節作用を有する生薬の成分としても知られている。また、EC、EG は *in vitro* において豚由来の膵リパーゼ活性を抑制することが報告されており [33]、MG は培養脂肪細胞におけるトリグリセリド分解作用や、培養肝細胞において CC 14 による培養細胞への影響を抑制することなども報告されている [34]。Fig. 8 に、SRE 中に含まれる化合物の一部を示した。

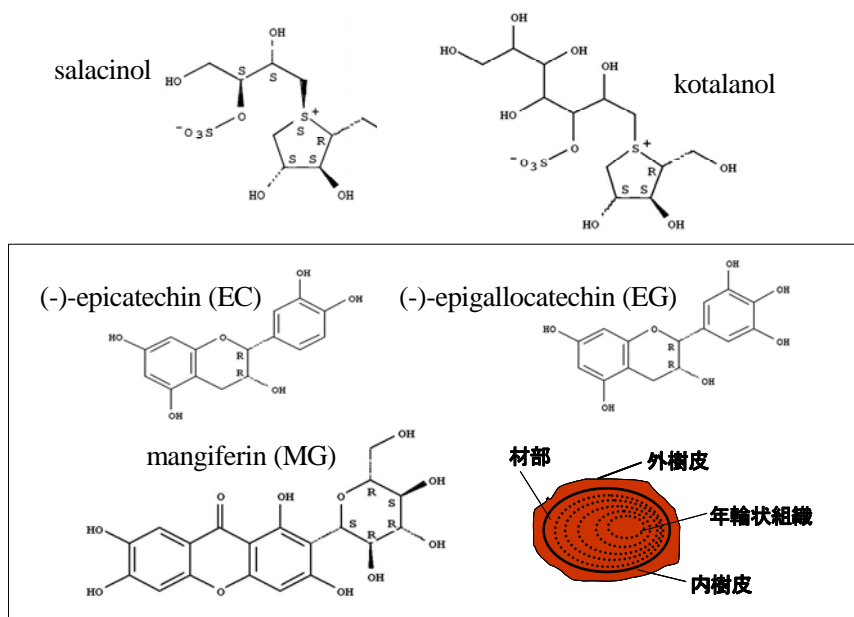


Figure 8. The compounds from the roots and stems of *Salacia reticulata*.

なお、これらのポリフェノール類は、Yoshikawa *et al.* が旋光度、MS 及び NMR などの機器分析データと文献値との比較により同定したものであるが[33]、本研究に用いたサラシア幹の鑑定でも、サラシア幹中に含有していることが証明されている。今後更なる詳しい分画は必要であるが、SRE 中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分を検討するために、先ず、EC、EG、MG を用いて実験を行うこととした。

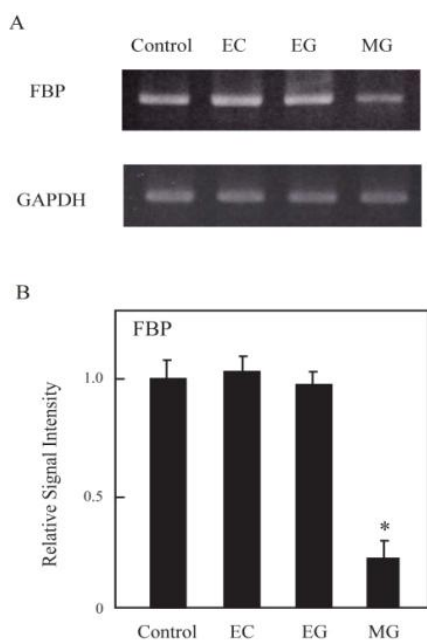


Figure 9. The effect of mangiferin on the FBP mRNA levels in IMH2 cells. IMH2 cells were treated with DMSO (Control), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EG) or mangiferin (MG) for 4 h. EC, EG and MG were each used at a concentration of 1×10^{-10} M. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide (A). The mRNA levels were normalized to the GAPDH mRNA level in each sample (B). Results represent means \pm SD derived from 3 independent experiments, each experiment carried out in 4 culture dishes. Photographs show the typical data of these experiments. * $P < 0.05$ vs. vehicle-treated cells.

EC、EG、およびMGを 1×10^{-10} M濃度でIMH2に作用させ、4h、37°Cでインキュベートした後、RT-PCR法でFBP遺伝子発現量を解析した。コントロール (C) としては、溶媒のみを作用させた。その結果、EC、EGはFBP mRNA量に影響を与えなかったが、MGはCに比べFBP mRNA量を約 1/4 に減少させた (Fig. 9)。

次に、 1×10^{-12} M～ 1×10^{-9} M濃度のMGをIMH2に作用させてFBP mRNA量を解析した。その結果、MGは濃度依存的にFBP mRNA量を減少させた (Fig. 10)。このことから、MGがSRE中に含まれる機能性成分の一つである可能性が考えられた。

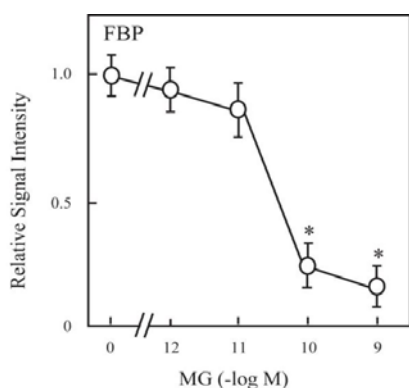


Figure 10. FBP mRNA levels of IMH cells treated with various concentrations (1×10^{-12} M~ 1×10^{-9} M) of mangiferin for 4 h. Results represent means \pm SD derived from 3 independent experiments, each experiment carried out in 4 culture dishes. * $P < 0.05$ vs. vehicle-treated cells.

第3節 2型糖尿病モデルマウスにおける空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討

*In vitro*の実験において、mangiferin (MG) がSRE中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の一つである可能性が考えられたことから、*in vivo*においてMGの空腹時血糖値降下作用を確認した。実験は、2型糖尿病モデルマウスであるKK-A^yマウスを用いた。

5週令の雄性KK-A^yマウスに、高脂肪食(クイック・ファット)を5週間摂取させ、糖尿病を発症させた後、MGを投与した。MGの投与量は、SRE中に含まれるMGの含有量から換算して、1日にマウス体重1kgに対して5mg(MG5群)、または25mg(MG25群)とし、MGを純水に溶解し飲水として投与した。コントロール(C)としては純水を投与した。MGは、飼料摂取量および体重増加量に影響を及ぼさなかった(data not shown)。

MGの投与を開始して2日目と、5日目に空腹時血糖値を測定した。投与2日目の空腹時血糖値は、MG5、MG25ともにCに比べ有意に降下していた。投与5日目の空腹時血糖値はMG5、MG25ともに降下が認められ、MG5はCに比べ空腹時血糖値が有意に降

下していた (Fig. 11)。このことから、MG が *in vivo* において空腹時血糖値を降下させることが確認できた。MG5 群、MG25 群において濃度依存性が認められなかったことは、投与量 5 mg で既にプラトーに達していたと考えられ、5 mg より低い投与量で実験した場合に濃度依存性が確認できる可能性が考えられた。

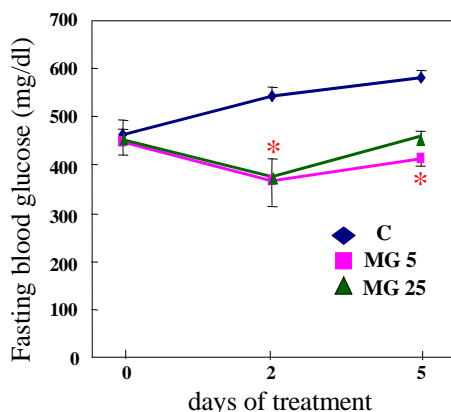


Figure 11. Mangiferin reduced fasting glucose levels in KK-Ay mice. C, control (distilled water); MG5, mangiferin 5 mg/body weight(kg) day MG 25, mangiferin 25 mg/body weight(kg) day. Data are means \pm SD; $n = 4$ in each group. * $p < 0.05$ vs. the control group.

次に、FBP mRNA 量に及ぼす MG の影響を検討した。MG を KK-Ay マウスに 1 週間投与した後、肝臓の total RNA を抽出し、RT-PCR 法に供した。MG5 群、MG25 群ともに FBP mRNA 量を減少させたが、C 群に比べて有意差は無かった (Fig. 12)。SRE を KK-Ay マウスに 4 週間投与した実験において、SRE は FBP mRNA 量を有意に減少させた。本実験では、MG の投与期間が 1 週間と短かったため、FBP mRNA 量に有意な影響を与えなかったと考えた。

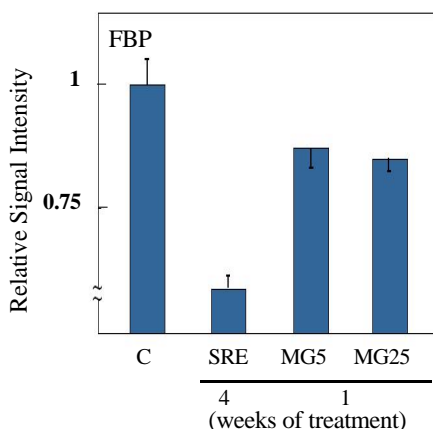


Figure 12. Effects of mangiferin on the mRNA levels of FBP in KK-Ay mice liver. KTE, aqueous extract from stems of Kothala himbutu; MG5, mangifemin 5 mg/body weight(kg) day MG 25, mangiferin 25 mg/body weight(kg) day. Data are means \pm SD; $n = 4$ in each group.

in vitro および *in vivo* の結果から、SRE 中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の一つとして MG が考えられた。

第4節 本章の小括および考察

本章では、SRE による血糖値調節機構を解析するために、*in vitro* において FBP 遺伝子発現量の調節機構の解明と、*in vitro* および *in vivo* において SRE 中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討を行った。

ビタミンAや甲状腺ホルモンなどの栄養素や生理活性物質が消化吸收後直接肝臓に作用し、遺伝子発現量に影響を及ぼすのに要する時間は、およそ4時間と推定されている[36, 37]。SRE凍結乾燥物(SRED)は培養肝細胞(IMH2)に作用後4時間でFBP mRNA量を有意に減少させた。IMH2において、SREDによるFBP mRNAの減少作用が認められたことから、IMH2を用いてSREによるFBP遺伝子発現量の調節機構を検討した。

近年、栄養素やホルモンなどの生理活性物質が、肝臓の糖代謝に関与する酵素であるacetyl-CoA carboxylaseやmalic enzymeのmRNAの転写調節または転写後調節に関与することが報告されている[38, 39]。SREDがFBP mRNAの転写調節に関与するか、または転写後調節に関与するかを検討するために、RNA合成阻害剤であるアクチノマイシンD(Act D)とたんぱく質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)を用いて検討を行った。Mano *et al.*は、Act DおよびCHXを用いて、甲状腺ホルモンが肝臓の9-*cis*retinoic receptors (RXRs) mRNAの制御において、転写レベルでRXR β を、転写後調節レベルでRXR γ を制御することを明らかにしている[36]。本実験で、Act DはSREDとともにFBP mRNA量を減少させ、その一方でCHXはSREDによるFBP mRNA量の減少作用を抑制した。これにより、SREがFBP mRNAの不安定化(分解)を促進している可能性が高いと考えた。SREによるFBP遺伝子発現調節機構のより詳細なメカニ

ズムを解明するためには、今後 FBP mRNA の半減期や Rnase 活性の測定などが考えられる[40, 41]。

次に、培養肝細胞株 IMH2 を用いて、SRE 中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討を行った。サラシアの根皮や樹皮からはサラシノールやコタラノール、トリテルペン類のほかにも多くのポリフェノール類が抽出されている。Yoshikawa *et al.* は、サラシアメタノール抽出液より、(-)-epocatechin (EC)、(-)-epigallocatechin (EG)、(-)-4'-*O*-methylepigallocatechin、(-)-epiafzelechin-(4 β →8)-(-)-4'-*O*-methylepigallocatechin、(-)-epicatechin-(4 β →8)-(-)-4'-*O*-methylepigallocatechin、mangiferin (MG) などの多くのポリフェノール類を単離しており、その中でも MG はその含有量が多いことが報告されている[33]。

MG は、マンゴー (*Mangifera indica* L.) の葉や樹皮、生薬の知母として用いられているユリ科植物のハナスゲ (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge.) の根茎から単離された xanthone 配糖体で[42, 43]、抗糖尿病作用、抗腫瘍作用、抗 HIV、免疫調節作用、抗酸化作用などの広範囲な薬理学的特性が報告されている[44-47]。また、MG の抗糖尿病作用としては、*in vitro* において二糖類分解酵素であるスクラーゼ、イソマルターゼの活性阻害作用と、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発ラットおよび KK-A_y マウスにおける血糖値調節作用などが報告されている[48-49]。

IMH2 に、(-)-epocatechin (EC)、(-)-epigallocatechin (EG)、および MG を作用させた結果、EC、EG は FBP mRNA 量に影響を及ぼさなかったが、MG は FBP mRNA 量を有意に減少させた。また、MG は濃度依存的に FBP mRNA 量を減少させた。

次に、2 型糖尿病モデルマウスである KK-A_y マウスを用いて MG の空腹時血糖値降下作用を検討した結果、MG はマウスの空腹時血糖値を有意に降下させることが確認できた。*in vitro* および *in vivo* の結果から、MG が SRE 中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の一つである可能性が考えられた。

Yoshimi *et al.* は、MG が KK-A_y マウスを用いた単回投与試験において、血糖値および血中インスリン濃度を降下させ、その作用は対照として用いた糖尿病治療薬のトルブタミド(SU 剤)より顕著であったと報告しており[49]、Muruganandan *et al.* は MG がストレプトゾトシン誘発性の糖尿病ラットにおいて血糖値調節作用を示すこと[48]を報告している。しかし、MG による血糖値調節作用の作用機構については明らかになっていない。本実験により、MG による *in vivo* における血糖値調節作用の作用機構として、肝臓での FBP 遺伝子発現調節を介した糖新生の抑制作用が関与している可能性が考えられた。また、本研究により MG による α -グルコシダーゼ阻害作用以外の新たな機能性を示すことができた。

本章の結果、MG は消化吸収後直接肝細胞に作用し FBP mRNA 量を減少させると考えられ、その作用機構として MG が FBP mRNA の不安定化（分解）を促進している可能性が考えられた。すなわち、mangiferin などの機能性成分は FBP 遺伝子発現調節を介して糖時新生を抑制し、空腹時血糖値を降下させると考えられ、SRE による血糖値調節機構の一部が解明できた。

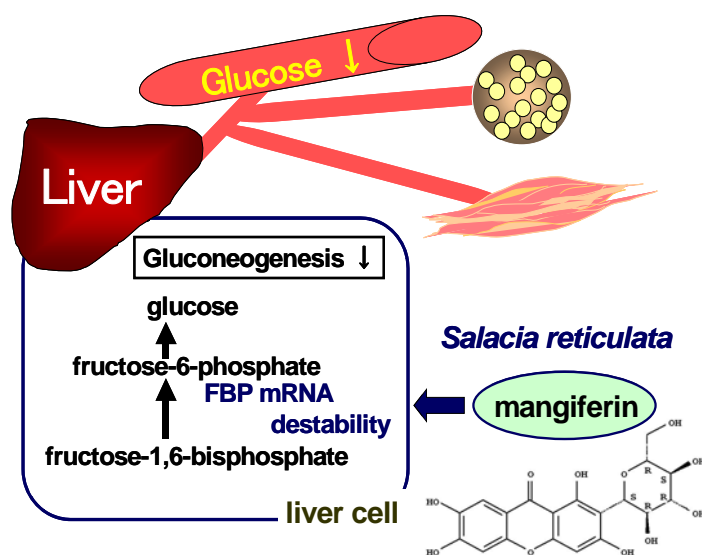


Figure 13. Mangiferin modulates FBP mRNA instability in hepatocyte.

第 3 章 高脂肪食を摂取させたマウスの酸素消費量 (VO_2 , oxygen consumption) ならびに脂肪組織に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

SRE による血糖値調節機構の解析を目的に、肝臓の糖代謝に着目して検討を行ってきた。SRE は糖新生の律速酵素 FBP の遺伝子発現調節を介して糖新生を抑制し、空腹時血糖値を低下させると考えられ、機能性成分の一つとして mangiferin が考えられた。

SRE は肝臓での糖新生を抑制して空腹時血糖値を低下させると考えられるが、肝臓から放出が抑制された糖の代謝経路は明らかになっていない。本章では、SRE による血糖値調節機構の解析を目的に、小動物用代謝測定システム [51] を用いて呼気中の気体組成を測定し、酸素摂取量 (VO_2) をおよび呼吸商 (RQ, respiratory quotient) を解析した。

SRE の抗肥満作用としては、サラシア根皮熱水抽出液が高脂肪食を摂取させた Sprague-Dawley ラットにおいて腎周囲脂肪重量を減少させたという報告や、サラシア幹抽出液およびサイクロデキストリンの混合物が高脂肪食を摂取させた C57BL/6J マウスにおいて体重と内臓脂肪蓄積量を減少させたという報告があるがそのメカニズムは不明である [33, 50]。本章では、SRE による内臓脂肪蓄積抑制作用のメカニズムを検討するために、脂肪組織に及ぼす SRE の影響を検討した [52]。

第 1 節 高脂肪食を摂取させたマウスの酸素消費量および呼吸商に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

実験は、5 週令の雄性 C57BL/6J マウスを用いて行った。呼気の測定は、SRE を摂取した直後から経時的に行う必要性から、本実験では、SRE を飲水として投与するのではなく、飼料にサラシア幹熱水抽出液凍結乾燥物 (SRED) を添加することとした。飼料は AIN93G

飼料を基本組成とし、次のように作製した。まず、脂質含有量の異なる2種類の飼料（普通食N、高脂肪食HF）を作製した。Nの脂質重量比は6%（w/w）、脂質エネルギー比は13.8%で、HFの脂質重量比は35%（w/w）、脂質エネルギー比は53.0%であった。NおよびHFに0.1%のSREDを添加した飼料を作製し、N+SREDおよびHF+SREDとした。マウスを4群（N、N+SRED、HF、HF+SRED）に分け、各飼料を各々9週間摂取させた。

実験飼料の給餌を開始して6週間目に、小動物用代謝測定システムを用いて酸素消費量（ VO_2 ）および呼吸商（RQ）を解析した。また、実験飼料を9週間摂取させた後、ジエチルエーテル麻酔下で採血し、肝臓、褐色脂肪組織および白色脂肪組織（睪丸周囲白色脂肪組織および腎周囲白色脂肪組織）を採取し、肝臓および白色脂肪組織重量を測定した。

呼気中の気体組成の測定は、小動物用代謝測定システムを用いて毎回19:00に給餌後、暗期（19:00-07:00）、明期（7:00-19:00）の12時間サイクルで24時間行った。普通食群（N、N+SRED）、高脂肪食群（HF、HF+SRED）各々3回ずつ測定を行い VO_2 及びRQを解析し、その平均値を算出した。

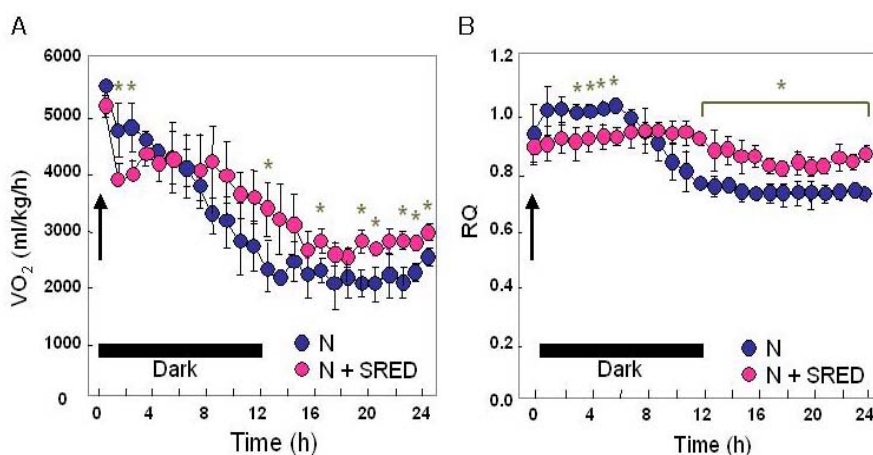


Figure 14. Effects of the freeze-dried aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRED) on whole-body oxygen consumption (VO_2) (A) and respiratory quotient (RQ) (B) were measured by indirect calorimetry. Values are means \pm SE, $n=3$. *The N + SRED group differed ($p < 0.05$) from the N group.

普通食群 (N、N+SRED) における VO_2 およびRQの解析結果をFig. 14 に示した。 VO_2 の解析結果、飼料摂取開始後にN群の VO_2 がN+SRED群に比べ増加していたが、その後すぐに逆転し、N+SRED群の VO_2 はN群に比べ有意に増加していた (Fig. 14, A)。このことから、サラシアはエネルギー代謝を促進すると考えた。RQの解析結果、N群のRQは暗期 (摂食時) が約 1.0 で、明期 (空腹時) が約 0.7 であった。一方、N+SRED群のRQは摂食時と空腹時の差が緩慢で、特に明期 (空腹時) がN群に比べ有意に高かった (Fig. 14, B)。これにより、N+SRED群ではN群に比べ空腹時にエネルギー源として糖の分解を促進していると考えた。

次に、高脂肪食 (HF、HF+SRED) における VO_2 およびRQの解析結果をFig. 15 に示した。 VO_2 の解析結果、HF+SRED群の VO_2 は、HF群に比べ有意に大きく、SREDによる VO_2 促進作用は普通食摂取時より顕著であった (Fig. 15, A)。

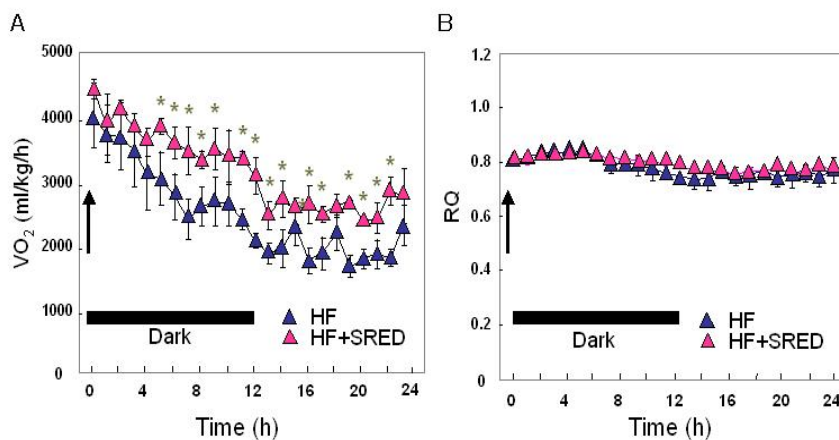


Figure 15. Effects of the freeze-dried aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRED) on whole-body oxygen consumption (VO_2) (A) and respiratory quotient (RQ) (B) were measured by indirect calorimetry. Values are means \pm SE, $n=3$. *The HF + SRED group differed ($p < 0.05$) from the HF group.

RQの解析結果、HF群のRQは摂食時が約0.8で、空腹時が約0.7であった。これは、高脂肪食の摂取により、摂食時に脂質の分解が促進されたと考えた。一方、HF+SRED群のRQは普通食と同様の傾向が認められた。すなわち、摂食時と空腹時の差が緩慢で、空腹時はHF群に比べRQが高くなっていた。VO₂およびRQの解析結果から、SREDは普通食と高脂肪食の両群においてエネルギー代謝を有意に促進し、特に空腹時に糖の分解を促進すると考えた。

実験期間、各群の飼料摂取量に有意差はなかった (Table 5)。体重増加量は、高脂肪食の摂取により HF (7.33 ± 1.96) が N (5.16 ± 1.46) に比べ有意に増加していた。また、N+SRED (2.17 ± 0.93) の体重増加量は N 比べ約 1/2 に、HF+SRED (3.43 ± 1.10) の体重増加量も HF に比べ約 1/2 に減少していた (Table 5)。SRED は普通食と高脂肪食の両群において、体重増加量を有意に減少させた。

Table 5. Effect of SRED on Food intake, Body Weight gain, and Liver and Adipose Tissue Weight

	N	N+SRED	HF	HF+SRED
Food intake (g/day)	2.32 ± 0.40	2.23 ± 0.15	2.24 ± 0.24	2.25 ± 0.17
Body weight gain (g)	5.16 ± 1.46 b	2.17 ± 0.93 c	7.33 ± 1.96 a	3.40 ± 1.10 bc
Liver weight (g/100 g body weight)	5.54 ± 0.51	5.49 ± 0.31	4.75 ± 0.34	4.87 ± 0.11
Adipose tissue weight				
Epididymal fat weight (g/100 g body weight)	1.59 ± 0.18 b	0.65 ± 0.12 b	3.99 ± 0.70 a	1.20 ± 0.27 b
Perirenal fat weight (g/100 g body weight)	0.40 ± 0.12 b	0.12 ± 0.03 c	1.68 ± 0.37 a	0.24 ± 0.06 bc

Values are \pm SD, $n = 7$. Values in a row with different superscript letters are significantly different by Tukey's least significant test at $p < 0.05$.

肝臓重量は、各群で有意差はなかった (Table 5)。睪丸周囲白色脂肪組織重量は、高脂肪食の摂取により、N (1.59 ± 0.18) に比べ HF (3.99 ± 0.70) が有意に増加していた。N+SRED (0.65 ± 0.12) および HF+SRED (1.20 ± 0.27) の睪丸周囲白色脂肪組織重量は N

および HF に比べ、約 1/2 および約 1/3 以下に減少していた。SRED は高脂肪食において、睾丸周囲白色脂肪組織重量を有意に減少させた。(Table 5)。腎周囲白色脂肪組織重量は、高脂肪食の摂取により、N (0.40 ± 0.12) に比べ HF (1.68 ± 0.37) が有意に増加していた。N+SRED (0.12 ± 0.03) および HF+SRED (0.24 ± 0.06) の腎周囲白色脂肪組織重量は N および HF に比べ、約 1/3 および約 1/6 以下に減少していた (Table 5)。SRED は普通食と高脂肪食の両群において、腎周囲白色脂肪組織重量を有意に減少させた。SRED はマウスにおいて、内臓脂肪の蓄積を抑制すると考えられ、その結果体重増加量を減少させたと考えた。

Table 6. Effects of SRED on Plasma Glucose, Insulin, Triglyceride and Free Fatty Acid

	N	N + SRED	HF	HF + SRED
Glucose (mg/dl)	232.7 ± 38.2 b	196.0 ± 91.3 b	454.2 ± 99.4 a	382.3 ± 85.9 a
Insulin (pg/ml)	298.3 ± 81.1 c	290.2 ± 72.2 c	1722.3 ± 505.5 a	815.3 ± 197.1 b
Triglyceride (mg/dl)	64.9 ± 7.6 b	60.1 ± 11.8 b	137.9 ± 26.4 a	136.6 ± 30.4 a
NEFA (μ Eq/ml)	1.10 ± 0.27 b	0.98 ± 0.16 b	1.72 ± 0.35 a	1.79 ± 0.28 a

Values are \pm SD, n = 7. Values in a row with different superscript letters are significantly different by Tukey's least significant test at $p < 0.05$.

次に、血中のグルコース、インスリン、トリグリセリド、および遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度を測定した。血中のグルコース、トリグリセリドおよび NEFA 濃度は、高脂肪食の摂取により、HF が N に比べ有意に増加していた。しかし、N と N+SRED、HF と HF+SRED ではともに有意差はなかった (Table 6)。血中インスリン濃度は高脂肪食の摂取により、HF (1722.3 ± 505.3) が N (298.3 ± 81.1) に比べ有意に増加していた。N と N+SRED (290.2 ± 72.2) では有意差はなかったが、HF+SRED (815.3 ± 197.1) の血中インスリン濃度は HF に比べ約 1/2 に降下していた。SRED はマウスにおいて高脂肪食に

よる血中インスリン濃度の上昇を有意に低下させた (Table 6)。

第2節 高脂肪食を摂取させたマウスの脂肪組織に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

SRED は、普通食と高脂肪食の両群において体重増加量および白色脂肪組織重量を有意に減少させた。また、SRED は高脂肪食による血中インスリン濃度の上昇を有意に低下させた。SRED の脂肪組織に及ぼす影響をさらに詳細に検討するために、脂肪細胞の大きさに及ぼす SRED の影響を検討した。

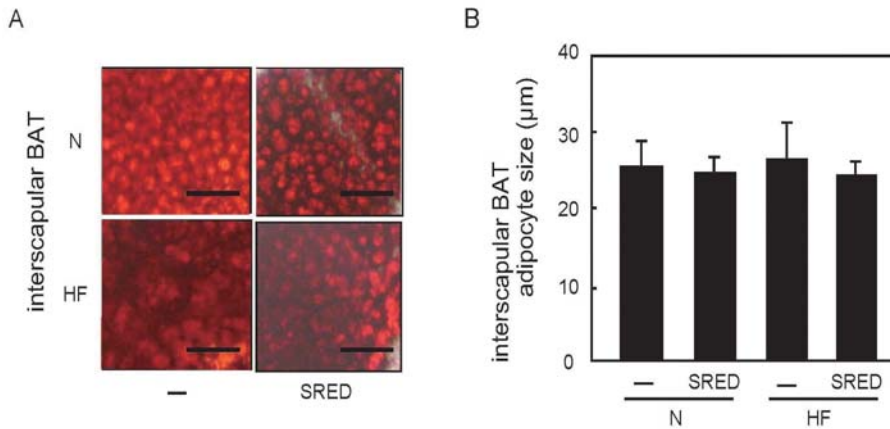


Figure 16. Effect of SRED on adipocyte size. A: Micrographs of interscapular BAT adipose cells. The cells were stained with oil red O. The scale bars indicate 100 μm. B: Average size of the adipocytes (n = 100) from the interscapular BAT of C57BL/6J mice on the N diet, N+SRED diet, HF diet, or HF+SRED diet. Data are expressed as means ± SD; n = 7. Data with different superscript letters are considered to be significantly different by Tukey's least significant test at $P < 0.05$.

N、N+SRED、HF、HF+SRED の 4 種類の飼料を各々9 間摂取させたマウスの褐色脂肪組織および睪丸周囲の脂肪組織を採取し、4%パラホルムで固定した後、オイルレッド O で染色した。オイルレッド O 染色は Ramirez-Zacarias *et al.* [53]の方法で行った。脂肪細

胞の直径をスケールで測定後、平均値を算出した。

Fig. 16 に、各群の褐色脂肪組織の写真と細胞直径の測定結果を示した。N、N+SRED、HF および HF+SRED の褐色脂肪細胞の直径は約 $25\ \mu\text{m}$ で、各群で有意差は無かった。

Fig. 17 に、各群の白色脂肪組織の写真と細胞直径の測定結果を示した。HF (157.2 ± 20.9) の脂肪細胞の直径は、N (80.3 ± 8.8) に比べ有意に大きかった。また、N+SRED (40.3 ± 2.2) および HF+SRED (52.7 ± 9.1) の脂肪細胞の直径は N および HF に比べ有意に小さくなっていた。SRED はマウスにおいて、高脂肪食により肥大化した白色脂肪細胞を有意に縮小させた。また、SRED は普通食においても白色脂肪細胞の大きさを有意に縮小させた。

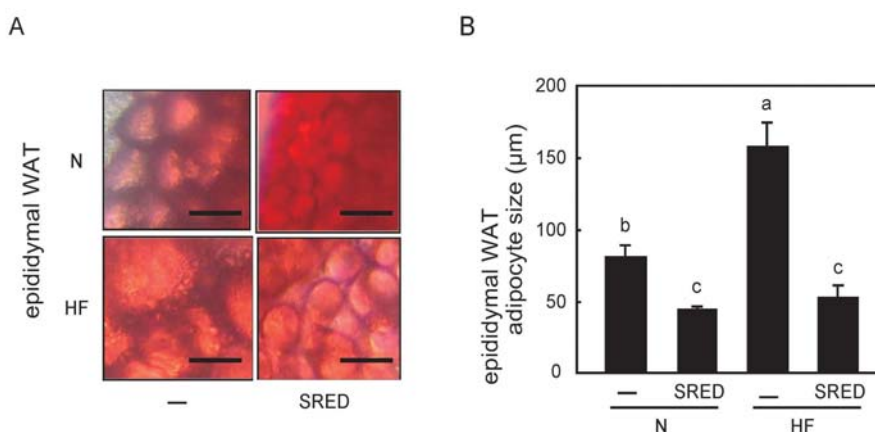


Figure 17. Effect of SRED on adipocyte size. A: Micrographs of epididymal WAT adipose cells. The cells were stained with oil red O. Scale bars indicate $100\ \mu\text{m}$. B: Average size of the adipocytes ($n = 100$) from the epididymal WAT of C57BL/6J mice on the N diet, N+SRED diet, HF diet, or SR+KTED diet. Data are expressed as means \pm SD; $n = 7$. Data with different superscript letters are considered to be significantly different by Tukey's least significant test at $P < 0.05$.

第3節 本章の小括および考察

本章では、SREによる血糖値調節機構を解析するために、小動物用代謝測定システムを用いて VO_2 および RQを解析した。また、SREによる内臓脂肪蓄積作用のメカニズムを検討するために、SREの脂肪組織に及ぼす影響を検討した。

C57BL/6J マウスに SRE を飲水として 3 週間投与し、DNA マイクロアレイを用いて肝臓の糖代謝に関与する遺伝子の発現量を解析した結果、「Affymetrix Microarray Suite 5.0」の「algorithm」による判定で、SRE は糖新生律速酵素の FBP と G6P の遺伝子発現量を減少させ、同時に解糖の律速酵素である phosphofructokinase と TCA 回路の酵素である isocitrate dehydrogenase と succinyl-CoA synthetase の遺伝子発現量を増加させた。また、SRE はグリコーゲン合成を促進する酵素である glycogen synthase の遺伝子発現量を減少させ、一方で UDP glucose からグルクロン酸への代謝に関与する酵素である UDP glucose dehydrogenase の遺伝子発現量を増加させた「54」(Fig. 18)。

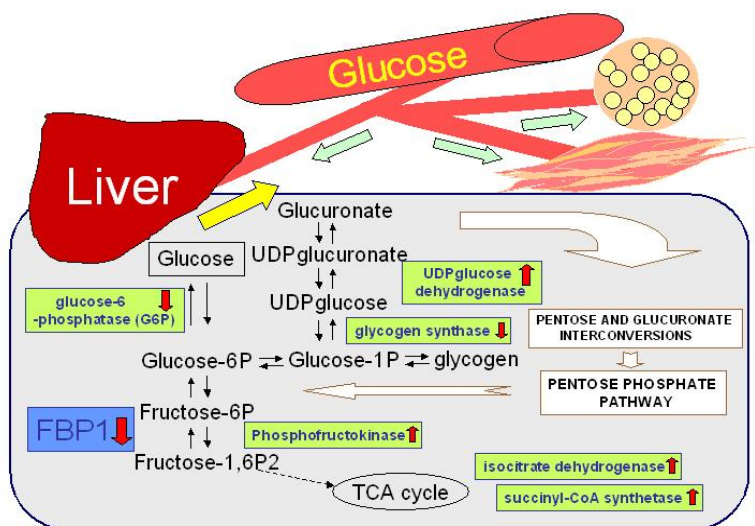


Figure 18. The result of DNA microarray analysis in C57BL/6J mice liver treated with SRE.

これらの結果から、肝臓からの放出が抑制された糖はペントースリン酸回路を経て、解糖およびTCA回路で代謝されると推測し、小動物用代謝測定システムを用いて呼気の測定を行い、酸素摂取量 (VO_2) および呼吸商 (RQ) を解析した。

実験の結果、SREDは普通食と高脂肪食の両群において VO_2 を有意に促進させ、SREDによる代謝促進作用は高脂肪食摂取時でより顕著であった。特にSREDは、空腹時にエネルギー源として糖の分解を促進した。このことから、空腹時に肝臓から放出が抑制された糖は、肝臓で分解されと考えられ、SREによる空腹時血糖値調節機構の一部が解明できた。

Ohnuki *et al.* は、カプサイシンやカプシエイトなどの成分がStd ddYマウスにおいてカテコールアミンの放出を促進させて、 VO_2 を増加させたと報告している[55]。また、Murae *et al.* は、茶カテキンが*in vitro*でカテコールアミン分解酵素であるカテコール-Oメチルトランスフェラーゼの活性を抑制し、高脂肪食を摂取させたC57BL/6Jマウスにおいて VO_2 を増加させたと報告している[56]。交換神経系から放出されたカテコールアミン類は、 β 3-アドレナリン受容体を介して白色脂肪組織において脂肪分解を促進し、褐色脂組織においては熱産生を促進するといわれている[57, 58]。SREは、C57BL/6Jマウスにおいてカテコール-OメチルトランスフェラーゼとモノアミンオキシダーゼA (カテコールアミン分解酵素) の遺伝子発現量を増加させた[54]。これにより、SREDによる VO_2 促進作用は、カテコールアミンが関与している可能性が低いと考えられたが、詳しい作用機構については今後の検討課題である。

近年、栄養素や天然化合物によるエネルギー代謝促進作用を検討する上で、uncoupling proteins (UCPs) の遺伝子発現制御に及ぼす影響が着目されている[59]。Klaus *et al.* は、緑茶に含まれる epigallocatechin gallate が食事誘導性の肥満マウスにおいて内臓脂肪の蓄積を抑制し、肝臓の UCP2 mRNA 量を増加させたと報告している [60]。また、Srivastava *et al.* は、LDL 欠損マウスにおいて peroxisome proliferator-activated

receptor α (PPAR α) のリガンドである高脂血症治療薬であるフェノフィブラートが肝臓の UCP2 mRNA 量の増加を介して体重増加量を減少させたと報告している[61]。SRE は、C57BL/6J マウスにおいて肝臓の UCP2 遺伝子発現量を減少させた [54]。これにより、SRED による内臓脂肪の蓄積抑制作用は UCP2 の遺伝子発現調節を介している可能性は低いと考えたが、詳しい作用機構については今後の検討課題である。

SRE 中に含まれる機能性成分の一つである mangiferin (MG)は *in vitro* において PPAR α レシフェラーゼ活性を促進し、PPAR α の下流にあるリポプロテインリパーゼの遺伝子発現量および酵素活性に影響を及ぼすことが報告されている[62]。SRE は、KK-Ay マウスにおいて、hepatic lipase の遺伝子発現量を増加させた[25]。これらのことから、SRE 中に含まれる機能性成分の一つである MG は脂質代謝および脂肪蓄積量にも影響を及ぼす可能性が考えられるが、MG の新たな機能性については今後の研究課題である。

SREDは普通食と高脂肪食の両群において、VO₂および糖質の分解を有意に促進させ、白色脂肪組織重量（睾丸周囲脂肪および腎周囲脂肪）を有意に減少させた。SREDは糖質の分解を促進することにより、最終的に内臓脂肪の蓄積を抑制し体重増加量を減少させたと考えた。

次に、脂肪細胞の大きさに及ぼす SRED の影響を検討した。褐色脂肪細胞および白色脂肪細胞の直径を測定した結果、SRED は褐色脂肪細胞の大きさには影響を及ぼさなかったが、白色脂肪細胞の大きさに影響を与えた。SRED は高脂肪食により肥大化した脂肪細胞のサイズを有意に縮小させ、普通食においても脂肪細胞のサイズを有意に縮小させた。

脂肪組織は体内のエネルギー蓄積（白色脂肪組織）や熱産生（褐色脂肪組織）に関与しており、哺乳類のエネルギー代謝において重要な役割を担っている [63]。特に近年、白色脂肪組織は、単にエネルギーを蓄積するだけの組織ではなく、レプチンやアディポネクチンなど 10 を超える内分泌因子（アディポサイトカイン）を分泌することにより、体内のエネルギー消費システムやインスリン抵抗性に関与していることが報告されている

[64]。

また、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインの種類には脂肪細胞の大きさが関与していることが明らかとなっている[65]。小型脂肪細胞からはレプチン、アディポネクチンなどのインスリン感受性ホルモンが、大型脂肪細胞からはTNF- α 、レジスチン、遊離脂肪酸などのインスリン抵抗性惹起分子が分泌されるといわれている [66]。PPAR γ のリガンドであるインスリン抵抗性改善薬のチアゾリジンジオンズ (TZDs) は、小型脂肪細胞の数を増加させ、アディポネクチンの分泌を促進させることが報告されている[66]。

本実験の結果、SRED は白色脂肪細胞の大きさを有意に縮小させたことから、インスリン感受性アディポサイトカインの分泌に影響を及ぼす可能性が考えられた。また、SRED は高脂肪食による血中インスリン濃度の上昇を有意に降下させた。これらのことから、SRED は高脂肪食により誘導されたインスリン抵抗性を改善する可能性が考えられたが、詳細は今後の検討課題である。

Kishino *et al.* は、サラシア幹熱水抽出液とサイクロデキストリンの混合物が C57BL/6J マウスと Sprague-Dawley ラットにおいて、高脂肪食により増加した内臓脂肪蓄積量とアディポサイトカイン (レプチン、アディポネクチン) 濃度を減少させたと報告しているが、そのメカニズムについては言及していない[50]。本実験により、SRED による内臓脂肪蓄積抑制作用のメカニズムの一部として、糖の分解促進作用が考えられた。

本章の結果、SREは呼吸商のデータから空腹時に糖の分解を促進することが明らかとなった。このことから、SREはFBP遺伝子発現調節を介して糖新生を抑制し、同時に糖の分解を促進することにより、空腹時血糖値を降下させると考えられ、SREによる空腹時血糖値調節機構の一部が解明できた。また、SREはマウスにおいてVO₂を有意に促進し、内臓脂肪の蓄積を抑制した。SREによる内臓脂肪蓄積抑制作用の作用機構の一つとして、糖の分解促進作用が考えられた。

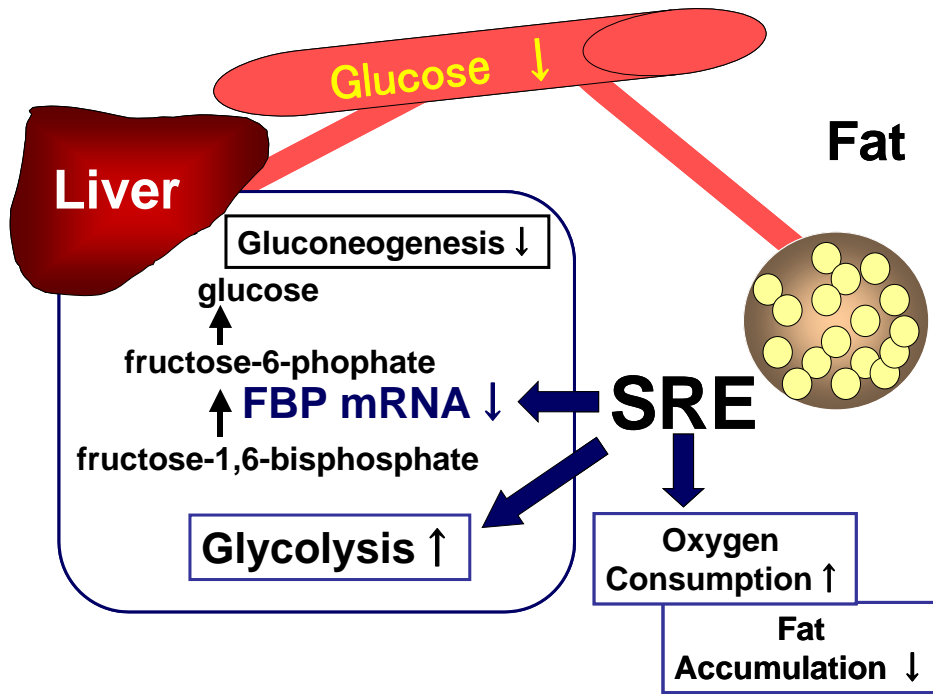


Figure 19. SRE may reduces gluconeogenesis, and it may promotes glycolysis. As a results of which SRE improved elevation of fasting blood glucose levels. SRE promotes oxygen consumption and it inhibit fat accumulation.

第 4 章 DNA マイクロアレイを用いたサラシア幹抽出液のゲノミクス (genomics) 食品安全性評価

第 1 章から第 3 章にかけてサラシアの食品機能性評価として、SRE による血糖値調節機構を解析し、SRE による内臓脂肪蓄積抑制作用の作用機構の一部を明らかにした。

サラシアは、スリランカの伝統医学アーユルベータにおいて糖尿病などに有効であると伝承されており、民間療法として用いられてきた歴史がある。現在もスリランカの市場ではサラシア幹粉碎物を配合したハーブティーなどが一般的に売られている。また、サラシアはスリランカ以外の米国や日本などの先進諸国において、健康食品として広く普及しており、健常人がフードサプリメントとして容易に購入し健康増進の目的で飲用する機会が増加している[67]。しかし、サラシアはスリランカにおいて食経験はあるものの、その安全性に関する研究は少なく、遺伝子発現レベルでの安全性評価は未だ行われていない。

本章では、DNA マイクロアレイを用いて SRE 投与によるマウス肝臓の遺伝子発現量に及ぼす影響を解析し、SRE のゲノミクス (genomics) 食品安全性評価とした [54]。

第 1 節 マウスの耐糖能に及ぼすサラシア幹熱水抽出液の影響

健康増進を目的としたサラシアの需要が拡大していることから、正常モデルマウスとして C57BL/6J マウスを用いて実験を行った。5 週令の雄性 C57BL/6J マウスに SRE (SRED 0.45 mg/ml) を飲水として 3 週間投与した。実験期間の飲水量は約 100 ml (SRED として約 45mg) であった。コントロールとしては純水を投与した。

投与期間、SRE の投与により体重増加量は減少傾向であったが、コントロールに比べて有意差はなかった (Table 7)。また、肝臓重量、空腹時血糖値に関しても SRE による影響は認められなかった。さらに、肝障害の指標である血清中ののアスパラギン酸アミノトラ

ンスフェラーゼ（AST）活性及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性に関しても、SRE 投与による影響は認められなかった（Table 7）。

Table 7. Body weight gain, liver weight, fasting blood glucose, and plasma parameters at the end of the experimental period.

	Control	SRE
Body weight gain (3 weeks)	5.1 ± 1.1	4.3 ± 1.4
Liver weight (g/100 g body weight)	5.64 ± 0.53	5.29 ± 0.39
Fasting blood glucose (mg/dl)	96.7 ± 4.2	91.7 ± 1.2
Plasma		
AST (U/l)	32.2 ± 4.2	34.4 ± 9.0
ALT (U/l)	14.1 ± 2.1	14.0 ± 5.0

Data are as mean ± SD, $n = 6 - 8$.

AST, asparate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase

SRE の投与を開始して 2 週間目に、経口糖負荷試験（Oral Glucose Tolerance Test, OGTT）を実施した。OGTT 試験は 16 時間の絶食後に行った。マウスに SRE と純水（コントロール）を各々 200 μ l 経口投与した後、体重 1 kg 当たり 2 g のグルコースを経口投与し、各時点での血糖値を測定した。

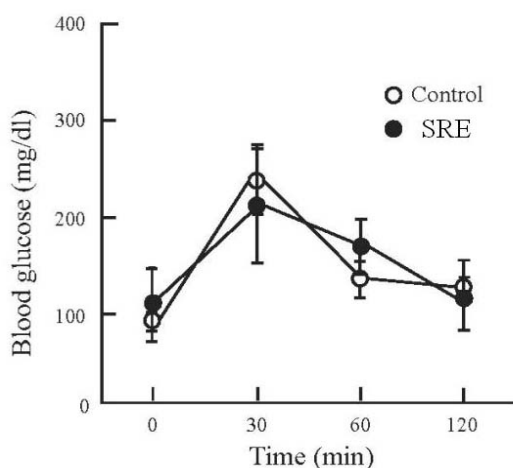


Figure 20. Influence of SRE on the blood glucose levels during the oral glucose tolerance test (OGTT). OGTT was performed on C57BL/6J mice administered with SRE or distilled water for drinking for 4 weeks. After 16 h of fasting, glucose (2 g/kg) was administered orally. Before administering glucose, the control mice were administered 200 μ L of distilled water and the SRE treated mice were administered 200 μ L of SRE. Each point represents the mean ± SD ($n = 6-8$)

OGTT 試験の結果を Fig. 20 に示した。SRE による血糖値の上昇及び降下はコントロールに比べ緩慢ではあったが、投与後 120 分ではほぼ同様の傾向を示した。このことから SRE には、マウスの耐糖能に影響を及ぼすような重要な毒性はないと考えた。

第 2 節 DNA マイクロアレイ解析を用いたサラシア幹熱水抽出液のゲノミクス (genomics) 食品安全性評価

SRE の投与は、C57BL/6J マウスの体重増加量、肝臓重量、空腹時血糖値、そして肝障害の指標である血中の AST 活性および ALT 活性、さらに耐糖能に影響を及ぼすような重要な毒性は認められなかった。次に、SRE のゲノミクス (genomics) 食品安全性評価として、DNA マイクロアレイを用いて肝臓の遺伝子発現量に及ぼす SRE の影響を解析した。

SRE を 3 週間投与した後、肝臓の total RNA を抽出し、SRE とコントロール各々 6 匹分の total RNA を混和し、DNA マイクロアレイ解析に供した。DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の GeneChip を用いた。

「Affymetrix Microarray Suite 5.0」を用いて解析した結果、12490 個の遺伝子が検出され、その中で、SRE とコントロールの両方で「Present」と判定された遺伝子は 5808 個であった。これらの遺伝子を 10 種類のカテゴリーに分類し、変動した遺伝子の数を Table 8 に示した。カテゴリーの分類は「transcription」(818)、「cell function」(705)、

「inflammatory/immune response」(110)、「metabolism」(xenobiotic, glutathione, carbohydrate, lipid, catecholamine, etc.) (1403)、「angiogenesis」(59)、「transport」(814)、

「stress response」(39)、「ribosomal proteins」(34)、そして「others」(522)とした。また、未だ機能が明らかになっていない遺伝子を「unknown」(1363)とした。これら遺伝子の中で、コントロールに比べ SRE の投与により遺伝子発現強度が 2 倍以上の遺伝子が 194 個、1/2 倍以下の遺伝子が 13 個であった。次に、各カテゴリーに含まれる遺伝子の数

と変動した遺伝子の数を用いて「National Institute of Allergy and Infections Disease」(NIAID) の「Database for Annotation, Visualization, an Integrated Discovery (DAVID)」[68]を用いて「Expressio analysis systemic explorer (EASE)」(Fisher Exact Test) [69]による統計解析を行った。解析結果(「EASE score」)を Table 8 に示した。各カテゴリーの「EASE score」は有意差 (<0.05) が認められなかった。この結果から、SRE の投与は上記のカテゴリーに含まれる遺伝子の発現量に有意な影響を与えないと考えた。

次に、oncogene および antioncogene の遺伝子発現量に及ぼす SRE の影響を検討した。SRE は Table 9 に示した 29 個の oncogene および 12 個の antioncogene の遺伝子発現量に影響を及ぼさなかった。

さらに、薬物代謝酵素の遺伝子発現量に及ぼす影響を検討した。薬物代謝酵素には大きく分けて 2 段階の酵素が存在する。第 1 段階の薬物代謝酵素は第 1 相酵素とよばれ、代表が肝臓のミクロソームなどに存在するチトクローム P450 (CYP) とよばれる酵素群で、第 2 段階の薬物代謝酵素 (第 2 相酵素) には抱合系解毒酵素のグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) などが含まれる。CYP について解析した結果、今回検出された遺伝子は 30 個であった。SRE はその中で 26 個の CYP 遺伝子の遺伝子発現量には影響を及ぼさなかった。コントロールに比べ SRE 投与により遺伝子発現量 (「SRE/Control Ratio」) が 2 倍以上の遺伝子は CYP51, CYP2C70, CYP2a5 で、1/2 倍以下の遺伝子は CYP7b1 であった (Table 10)。次に、GST について解析した結果、今回検出された遺伝子は 20 個で、コントロールと SRE の両方で「Present」と判定された遺伝子は 18 個であった。

「SRE/Control Ratio」が 2 倍以上の遺伝子は Gstm2、Gsta4、Gstm5、Gstt1、Gsta2、Gstm6 であった (Table 11)。

Table 8. Gene expression in C57BL/6J mice treated with SRE

Affymetrix ID	Gene	SRE/Control Ratio	EASE score
Transcription (818)			0.760
Upregulated			
92554_at	C-terminal binding protein 2	2.31	
93802_at	metadherin	2.22	
94292_at	serine/threonine kinase receptor associated protein	2.03	
98951_at	transcription factor 25	2.14	
97506_at	ring finger protein 2	2.06	
101529_g_at	transcription elongation factor A (SII) 1	2.11	
102062_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	2.16	
102344_s_at	transcription elongation factor A (SII) 3	2.56	
103073_i_at	TAF9 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	2.20	
103668_at	suppressor of Ty 6 homolog	2.29	
97974_at	zinc finger protein, multitype 1	2.05	
99076_at	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2	2.85	
101465_at	signal transducer and activator of transcription 1	3.26	
104010_at	zinc finger with KRAB and SCAN domains 14	2.06	
93006_at	nuclear factor I/C	2.02	
93164_at	ring finger protein 2	2.25	
97185_at	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	2.25	
102144_f_at	splicing factor proline/glutamine rich	2.33	
160117_at	thyrotroph embryonic factor	2.53	
160377_at	TAR DNA binding protein	2.24	
160495_at	aryl-hydrocarbon receptor	2.02	
160681_at	poly (A) polymerase alpha	2.36	
160941_at	phosphodiesterase 8A	2.23	
160979_at	C-terminal binding protein 2	2.56	
161562_f_at	zinc finger protein 787	2.43	
93829_at	ROD1 regulator of differentiation 1	2.19	
160663_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	2.04	
160722_at	RNA methyltransferase like 1	2.06	
Downregulated			
94480_at	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 161	0.28	
Cell function (705)			0.83
Upregulated			
98948_at	guanine nucleotide binding protein-like 3	2.28	
97506_at	ring finger protein 2	2.06	
94338_g_at	growth arrest specific 2	2.40	
93164_at	ring finger protein 2	2.25	
160843_at	spindlin 1	2.72	
93764_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1	2.06	
94524_at	death associated protein 3	3.19	
97519_at	secreted phosphoprotein 1	2.25	
94338_g_at	growth arrest specific 2	2.40	
95030_at	prolactin receptor	2.05	
96753_at	B-cell CLL/lymphoma 7C	2.07	
102921_s_at	fas (TNF receptor superfamily member)	2.06	
103446_at	interferon induced with helicase C domain 1	2.27	
104157_at	FAST kinase domains 5	3.21	
100033_at	mutS homolog 2	2.44	
92596_at	calcyclin binding protein	2.17	
96104_at	Ring finger protein 145	2.47	
98635_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2Z	2.14	
104037_at	RWD domain containing 4A	2.10	
98972_at	ubiquitin specific peptidase 8	2.02	
99990_at	retinoblastoma binding protein 6	2.02	
99669_at	lectin, galactose binding, soluble 1	2.14	
99062_at	poliovirus receptor-related 3	2.52	
103506_f_at	desmocollin 2	2.76	
97288_at	PDZ domain containing 1	2.06	
98946_at	WD repeat and SOCS box-containing 1	2.41	
Downregulated			
98067_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	0.28	
102016_at	cell death-inducing DFFA-like effector	0.26	
Inflammatory/Immune response (110)			0.188
Upregulated			
103617_at	CD55 antigen	2.02	
92222_f_at	histocompatibility 2, Q region locus 1	2.16	

Table 8. *Continued*

Affymetrix ID	Gene	SRE/Control Ratio	EASE score
Metabolism (Xenobiotic, Glutathione, Carbohydrate, Lipid, Catecholamine, etc.) (1403)			0.51
Upregulated			
94916_at	cytochrome P450, family 51	2.43	
95043_at	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70	3.01	
102847_s_at	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5	3.66	
93009_at	glutathione S-transferase, mu 2	2.78	
96085_at	glutathione S-transferase, alpha 4	5.09	
96258_at	microsomal glutathione S-transferase 3	5.30	
100042_at	hydroxyacyl glutathione hydrolase	2.17	
100629_at	glutathione S-transferase, mu 5	2.89	
95019_at	glutathione S-transferase, theta 1	2.13	
101872_at	glutathione S-transferase, alpha 2	4.20	
104637_at	glutathione S-transferase, mu 6	2.38	
96789_i_at	galactose mutarotase	2.49	
96803_at	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	2.57	
161594_f_at	galactose mutarotase	2.29	
162031_f_at	galactose mutarotase	2.13	
160428_at	succinyl-CoA synthetase	2.00	
96627_at	phenylalkylamine Ca2+ antagonist (emopamil) binding protein	2.41	
102769_f_at	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog	2.63	
103665_at	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids	3.42	
104285_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	2.28	
101945_g_at	lysophospholipase 1	2.27	
160388_at	sterol-C4-methyl oxidase-like	3.66	
160737_at	lanosterol synthase	2.05	
93542_at	phosphotriesterase related	2.17	
93749_at	monoamine oxidase A	2.09	
98535_at	catechol-O-methyltransferase	2.02	
94380_at	insulin degrading enzyme	2.02	
102938_at	leukocyte cell-derived chemotaxin 2	2.03	
160934_s_at	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1	2.07	
102017_at	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B	2.19	
99960_at	mitogen activated protein kinase kinase 4	2.10	
92192_s_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	2.01	
92767_at	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	2.07	
92937_at	fibroblast growth factor receptor 4	2.03	
160632_at	protein kinase C	2.50	
99521_at	adenylate kinase 3 alpha-like 1	3.16	
99959_at	adenylate kinase 3 alpha-like 1	2.06	
92492_at	adenylate kinase 3	2.48	
101489_at	S-adenosylmethionine decarboxylase 1	2.14	
100323_at	S-adenosylmethionine decarboxylase 1	2.19	
102773_at	carbonic anhydrase 8	2.38	
160375_at	carbonic anhydrase 3	3.80	
103391_at	cysteine conjugate-beta lyase 2	3.11	
160628_at	glycine C-acetyltransferase	2.28	
Downregulated			
92898_at	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	0.45	
161345_f_at	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	0.49	
102192_r_at	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	0.35	
Angiogenesis (59)			1.00
Upregulated			
96038_at	ribonuclease, RNase A family 4	2.00	
102373_at	glutamyl aminopeptidase	2.20	
102698_at	endothelial PAS domain protein 1	2.31	
Transport (814)			0.510
Upregulated			
101913_at	chloride channel 5	2.32	
102662_at	asialoglycoprotein receptor 2	2.70	
103271_at	low density lipoprotein receptor-related protein 6	2.84	
103958_g_at	transferrin receptor	2.33	
94792_at	macrophage scavenger receptor 1	2.37	
96078_g_at	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1	2.02	
94433_at	solute carrier family 38, member 2	2.00	
100491_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2	2.01	
94797_at	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 1	2.26	
96331_at	sorting nexin 2	2.08	

Continued on the next page.

Table 8. *Continued*

Affymetrix ID	Gene	SRE/Control Ratio	EASE score
97505_at	ADP-ribosylation factor-like 1	2.07	
103703_f_at	similar to integral membrane transport protein UST1R	2.91	
92294_at	ADP-ribosylation factor-like 5A	2.28	
93711_at	secretory protein SEC23 related gene	2.22	
94322_at	squalene epoxidase	3.12	
92840_at	nucleoporin 54	2.07	
103619_at	cytochrome b5 type B	2.38	
96276_r_at	transmembrane 9 superfamily member 3	2.25	
103702_i_at	similar to integral membrane transport protein UST1R	2.36	
96227_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 6	3.94	
98969_at	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	3.73	
100491_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2	2.01	
100951_at	polycystic kidney disease 2	2.15	
103702_i_at	similar to integral membrane transport protein UST1R	2.36	
104421_at	flavin containing monooxygenase 3	4.67	
92763_at	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7	3.01	
Downregulated			
94642_at	guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 2	0.30	
100078_at	mouse apolipoprotein A-IV	0.38	
Stress (39)			0.403
Upregulated		—	
Downregulated		—	
Ribosomal (34)			0.633
Upregulated		—	
Downregulated		—	
Others (522)			0.0825
Upregulated			
103076_at	chromatin modifying protein 5	2.30	
102240_at	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha	2.52	
94379_at	kinesin family member 1B	2.04	
94325_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	2.34	
101837_g_at	protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform	2.10	
97778_at	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	3.94	
94818_at	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	2.05	
96623_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	2.86	
93575_at	gamma-glutamyl hydrolase	2.46	
98934_at	lethal, Chr 7, Rinchik 6	2.20	
99669_at	lectin, galactose binding, soluble 1	2.14	
93183_at	CDC91 cell division cycle 91-like 1	2.07	
96775_at	chromobox homolog 1	2.23	
99535_at	CCR4 carbon catabolite repression 4-like	3.79	
96207_at	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	2.12	
103944_at	RAD51-like 1	2.07	
102225_at	RAB GTPase activating protein 1-like	2.12	
102696_s_at	phosphatidylinositol transfer protein, beta	2.23	
104202_at	transmembrane protein 1	2.50	
93212_at	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	2.02	
96572_at	5-azacytidine induced gene 2	2.25	
160135_at	nitrilase family, member 2	2.28	
160365_at	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2	2.15	
98349_at	interleukin 6 signal transducer	2.02	
Downregulated			
97487_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 2	0.46	
102016_at	cell death-inducing DFFA-like effector c	0.26	
100431_at	leptin receptor	0.47	
Unknown (1363)			0.0797
Upregulated			
95050_at	cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing, zinc-binding protei	2.32	
96258_at	microsomal glutathione S-transferase 3	5.30	
96351_at	basic transcription factor 3-like 4	2.06	
98530_at	growth arrest specific 5	3.74	
99649_at	glutamate cysteine ligase	2.01	
100042_at	hydroxyacyl glutathione hydrolase	2.17	
101966_s_at	ring finger protein 13	2.11	
103871_at	sec23 interacting protein	2.09	
96215_f_at	uc53a11.r1 Mus musculus cDNA, 5' end	3.00	
97402_at	indolethylamine N-methyltransferase	3.74	
98428_at	spastin	2.80	

Continued on the next page.

Table 8. *Continued*

Affymetrix ID	Gene	SRE/Control Ratio	EASE score
99988_at	dymecilin	2.24	
100949_at	cDNA sequence BC004044	2.25	
101380_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14	2.17	
101393_at	annexin A3	2.32	
101404_at	coiled-coil domain containing 115	2.16	
103497_at	cDNA sequence BC025546	2.15	
103519_at	carboxylesterase 1	2.54	
103744_at	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	2.32	
103982_s_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	2.57	
103983_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	3.32	
103986_at	inhibin beta-C	2.88	
104398_at	tetraspanin 33	2.09	
104640_f_at	josephin domain containing 3	2.08	
104643_at	WW, C2 and coiled-coil domain containing 1	2.26	
93646_at	twinfilin, actin-binding protein, homolog 1	2.22	
94192_at	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 10	3.30	
96494_at	kelch-like 24	2.49	
96518_at	WW, C2 and coiled-coil domain containing 1	2.19	
101179_at	aspartate-glutamate-alanine-aspartate box polypeptide 6	2.44	
160678_at	tetraspanin 12	2.35	
160697_at	expressed sequence C77080	2.39	
162058_f_at	AV271456 Mus musculus cDNA, 3' end	3.11	
160217_at	RIKEN cDNA 2310001A20 gene	2.26	
103403_at	RIKEN cDNA 2310007H09 gene	3.18	
98594_at	RIKEN cDNA 1190002N15 gene	2.58	
102920_at	RIKEN cDNA 1810054D07 gene	2.01	
Downregulated			
X00686_M_at	mouse gene for 18S rRNA.	0.30	
103460_at	DNA-damage-inducible transcript 4	0.43	

Categories are gene ontology biological processes. EASE score is the Fisher Exact Statistic for the likelihood that the number of genes found filtered list occurred by chance sampling of the MG-U74A probe set population.

Table 9. The gene expression of the oncogenes and anti-oncogenes.

Oncogene	Chnge	Oncogene	Chnge	Anti-oncogene	Chnge
alk	NC	ink4	NC	asp	NC
aml1	NC	jun	NC	brcaA1	NC
cbp/p300	NC	kit	NC	dcc	NC
cyclin D1	NC	maf	NC	fhit	NC
e2f	NC	mdm2	NC	i(2)g1	NC
erbA/ear	NC	met	NC	nf1	NC
erB	NC	myc	NC	nf2	NC
ets	NC	os	NC	p16	NC
evi-1	NC	p21	NC	p53	NC
fos	NC	raf	NC	p107/p130	NC
fms	NC	ras	NC	rb	NC
fps/fes	NC	src	NC	wt1	NC
gadd45	NC	vav	NC		
gap	NC	wnt	NC		
hst-1/fgf4	NC				

Table 10. The gene expression of the cytochrome p450 enzymes

Genes	Change	Genes	Change
CYP1A2 (hCYP1A2)	NC	CYP7B1	0.45
CYP2A5	3.06	CYP8B1	NC
CYP2A12	NC	CYP2C38	NC
CYP3A11	NC	CYP2C39	NC
CYP3A13 (hCYP3A4)	NC	CYP2C54	NC
CYP3A25	NC	CYP2C70	3.01
CYP4A10	NC	CYP2D9	NC
CYP4A12	NC	CYP2D10	NC
CYP4A14	NC	CYP2D26	NC
CYP7A1	NC	CYP2E1 (CYP2E1)	NC
CYP17A1	NC	CYP2F2	NC
CYP21A1	NC	CYP4F13	NC
CYP26A1	NC	CYP2J5	NC
CYP2B10	NC	CYP4V3	NC
CYP4B1	NC	CYP51	2.43

Table 11. The gene expression of the glutathione S-transferases

Affymetrix ID	Gene	SRE/Control Ratio
93009_at	glutathiones S-transferase, mu2	GSTm2 2.8
93015_at	glutathiones S-transferase, alpha3	1.9
93543_f_at	glutathiones S-transferase, mu1	1.6
96085_at	glutathiones S-transferase, alpha4	GSTa4 5.1
96670_at	glutathiones S-transferase, kappa1	1.7
97819_at	glutathiones S-transferase, omega1	1.4
99583_at	glutathiones S-transferase, pi1	1.0
100629_at	glutathiones S-transferase, mu5	GSTm5 2.9
100630_f_a	glutathiones S-transferase, mu5	0.8
104603_at	glutathiones S-transferase, theta2	1.5
95019_at	glutathiones S-transferase, theta1	GSTt1 2.1
101872_at	glutathiones S-transferase, alpha2	GSTa2 4.2
104636_at	glutathiones S-transferase, mu6	1.8
104637_at	glutathiones S-transferase, mu6	GSTm6 2.4
97681_f_at	glutathiones S-transferase, mu3	1.9
97682_r_at	glutathiones S-transferase, mu3	1.5
160350_at	glutathiones S-transferase, zeta1	1.4
161357_r_at	glutathiones S-transferase, mu2	0.9

第3節 本章の小括および考察

食品機能性評価の方法は、*in vitro* から *in vivo* まで多彩であるが[70]、栄養学研究において、ハイスループットな遺伝子工学的手法を用いて研究を行うニュートリゲノミクスが着目されている[71]。近年、DNA マイクロアレイ解析法は食品や天然化合物などの食品安全性評価において、有用なツールとして広く用いられている[72, 73]。

サラシアによる食品安全性評価に関する研究は少なく肝臓の遺伝子発現レベルでの研究は未だ行われていない。サラシアの安全性評価としては、ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験[74]やモルモットを用いた抗原性試験や光毒性試験[75]などが行われているが、そのどれもが限定された影響を評価するものであり、複数の影響を一度に評価するのは困難である。

本研究では、DNA マイクロアレイを用いてマウス肝臓の遺伝子発現量に及ぼす SRE の影響を網羅的に解析し、SRE のゲノミクス (genomics) 食品安全性評価とした。

本章の結果、SRE はマウスの体重増加量、空腹時血糖値、肝臓重量、肝障害の指標である血中の AST 及び ALT 活性、さらに耐糖能にも影響を及ぼさなかった。

DNA マイクロアレイ解析の結果、SRE は EASE (DAVID) による統計解析で、「transcription」、「cell function」、「inflammatory/immune response」、「metabolism」(xenobiotic, glutathione, carbohydrate, lipid, catecholamine, etc.)、「angiogenesis」、「transport」、「stress response」、「ribosomal proteins」、「others」、「unknown」のカテゴリーに分類される遺伝子の遺伝子発現量に有意な影響を及ぼさなかった。加えて SRE は、「alk」、「cyclin D1」、「erbA/ear」、「erB」、「fos」、「jun」、「myc」、「ras」、「src」を含む 29 個の oncogene、「p16」、「p53」、「p170/p130」、「rb」、「wt1」を含む 12 個の antioncogene の遺伝子発現量にも影響を及ぼさなかった。

次に、SRE の薬物代謝酵素の遺伝子発現量に及ぼす影響を検討した。ヒトの薬物代謝に

関与する CYP の数は 50 以上といわれているが、その中で、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 の 6 種類が薬物代謝の 90%以上に関与するといわれている[76]。その中でも CYP3A4 と CYP 2 D6 が最も多く薬物代謝に関与していることが報告されている[77]。SRE の投与はヒトの CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4 に相当するマウス遺伝子の遺伝子発現量に影響を及ぼさなかった。また、ヒトの CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 に相当するマウスの遺伝子は今回検出されなかった。SRE の投与により遺伝子発現量が変動したマウスの CYP51、CYP2C70、CYP2a5 および CYP7b1 については、未だ詳しい機能が解明されておらず、今後の検討課題である。

SRE は Gstm2、Gsta4、Gstm5、Gstt1、Gsta2、Gstm6 などの GST 遺伝子発現量を増加させた。肝障害を起こすといわれている食品としては、コンフリー (*Symphytum officinale*)、ノニ (*Morinda citrifolia*)、ブラックコホッシュ (*Cimicifuga racemosa*) などが知られている [78-81]。これらの食品は、一般的に CYP および GST などの薬物代謝酵素の遺伝子発現量を 20~100 倍の範囲で変化させることが報告されている[78, 79]。しかし、SRE による CYP および GST 遺伝子発現量の変化はいずれも 2~5 倍の範囲であり、今後 RT-PCR などの詳しい検討が必要であると考えられるが、この範囲の遺伝子発現量の変化が、直ちに実際の代謝に影響を及ぼす可能性は極めて低いと予想される。また、本実験において SRE は AST 活性及び ALT 活性に影響を及ぼさなかった。加えて SRE による肝保護および抗酸化作用が肝障害モデルマウスを用いた実験で報告されている[34]。これらの結果から、今後更なる詳しい検討が必要ではあるが、SRE が肝障害を起こす可能性は極めて低いと判断した。

本章のゲノミクス (genomisc) 食品安全性評価の結果、SRE は EASE score による統計解析の結果、肝臓の遺伝子発現量に有意な影響を及ぼさないと判断した。さらに、SRE による肝障害の可能性も極めて低いと判断した。

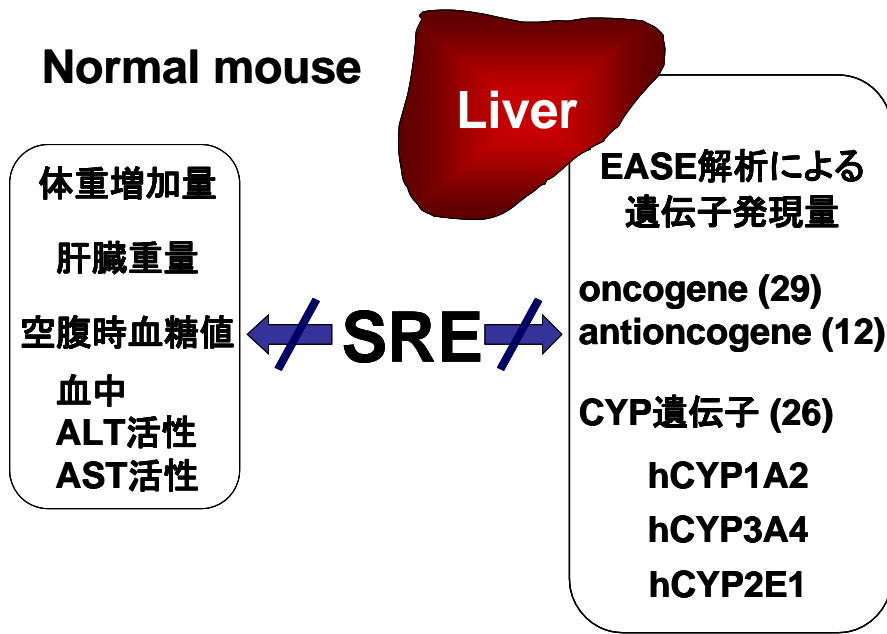


Figure 21. Genomics safety evaluation of SRE in normal mice.

総括

本研究は、スリランカ原産植物であるサラシア・レティキュラータ（サラシア）による食品機能性評価を目的に実験を行った。すなわち、サラシアの機能性食品としての科学的根拠を明らかにするために、DNAマイクロアレイ解析法やRT-PCR法などの遺伝子工学的手法を用いてメカニズムの解明を行った。先ず、サラシアによる血糖値調節機構を解析するために、マウス肝臓の遺伝子発現量に及ぼすサラシア幹熱水抽出液（SRE）の影響を解析し、*in vitro*でSREによる遺伝子発現量の調節機構を検討した。また、*in vitro*および*in vivo*でSRE中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討を行い、空腹時に肝臓から放出が抑制された糖の代謝経路を明らかにするために、*in vivo*で酸素消費量（VO₂, oxygen consumption）および呼吸商（respiratory quotient）を解析した。さらに、サラシアによる内臓脂肪蓄積抑制作用のメカニズムを解析するために、脂肪組織に及ぼすSREの影響を検討した。加えて、機能性食品としてのサラシアの安全性を評価するために、マウス肝臓の遺伝子発現量に及ぼす影響を検討し、SREのゲノミクス（genomics）食品安全性評価とした。

本研究に基づき、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. SRE は 2 型糖尿病モデルマウスにおいて、空腹時血糖値を有意に降下させ、その作用機構として消化管での α -グルコシターゼ阻害作用以外の可能性を示すことができた。SRE は 2 型糖尿病モデルマウスにおいて、DNA マイクロアレイ解析の結果、肝臓の糖代謝に関与する遺伝子の発現量に影響を及ぼし、DNA マイクロアレイ解析法と RT-PCR 法の二つの解析法において、糖新生の律速酵素である FBP の遺伝子発現量を減少させることを見出した。このことから、SRE は FBP の遺伝子発現調節を介して糖新生を抑制し、空腹時血糖値を降下させる可能性があることを示すことがで

きた。

2. SRE はマウス培養肝細胞株 (IMH2) において、培養細胞に作用後 4 時間で FBP mRNA 量を減少させ、その作用機構として SRE が FBP mRNA の不安定化 (分解) を促進している可能性を示すことができた。このことにより、SRE による FBP 遺伝子発現量の調節機構の一部を明らかにした。
3. SRE 中に含まれるポリフェノール類の一種である mangiferin は、*in vitro* において FBP mRNA 量を濃度依存的に減少させ、*in vivo* において 2 型糖尿病モデルマウスの空腹時血糖値を有意に降下させた。このことから、SRE 中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の一つとして mangiferin が考えられた。すなわち、mangiferin は肝細胞に直接作用し、FBP mRNA の不安定化 (分解) を促進することにより、糖新生を抑制し、空腹時血糖値を降下させると考えられ、サラシアによる血糖値調節機構の一部を明らかにした。
4. SRE は *in vivo* において、普通食と高脂肪食の両群で VO_2 を有意に促進したことからエネルギー代謝を促進すると考えられ、RQ のデータから空腹時にエネルギー源として糖の分解を促進することを見出した。このことにより、空腹時に肝臓から放出が抑制された糖は、肝臓で分解されると考えられ、SRE による血糖値調節機構の一部を明らかにした。
5. SRE は *in vivo* において、普通食と高脂肪食の両群で内臓脂肪蓄積量を有意に減少させ、体重増加量を有意に減少させた。SRE は褐色脂肪細胞の大きさには影響を及ぼさなかったが、白色脂肪細胞の大きさを有意に縮小させた。SRE による内臓脂肪蓄積抑制作用のメカニズムの一つとして、SRE による糖の分解促進作用が考えられ、SRE による糖・脂質代謝改善作用の可能性を示すことができた。
6. 正常モデルマウスにおけるゲノミクス (genomisc) 食品安全性評価の結果、SRE は EASE 解析でマウス肝臓の遺伝子発現量に有意な影響を与えず、29 個の oncogene、

12 個の antioncogene の遺伝子発現量にも影響を及ぼさなかった。また、30 個の CPY 遺伝子中 26 個の CYP 遺伝子に影響を及ぼさず、特に最も多くの薬物代謝に関与するといわれているヒトの CYP3A4 などに相当するマウスの CYP 遺伝子の遺伝子発現量に影響を及ぼさないことを見出した。本実験により、SRE による肝障害の可能性は極めて低いと判断した。

本研究により、サラシアによる血糖値調節機構の一部を明らかにできた。すなわち、サラシアは糖新生の律速酵素である FBP mRNA の不安定化（分解）を促進することにより糖新生を抑制し、同時に RQ のデータから糖の分解を促進することにより、空腹時血糖値を低下させることを見出した。また、サラシア中に含まれる空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の一つとして mangiferin を見出した。さらに、サラシアによる VO_2 促進作用は顕著で、サラシアが内臓脂肪の蓄積を抑制し、白色脂肪細胞の大きさを縮小させることを見出した。サラシアによる内臓脂肪蓄積抑制作用の作用機構の一部として、糖の分解促進作用が考えられ、サラシアによる糖・脂質代謝改善作用の可能性を示すことができた。加えて、サラシアのゲノミクス (genomics) 食品安全性評価を行うことにより、マウス肝臓の遺伝子発現レベルでのサラシアの安全性を示した。これらの結果から、サラシアが機能性食品素材として有効性が高いことを示すことができた。

今後、本研究の知見が、科学的根拠（エビデンス）に基づいた機能性食品の開発と普及に貢献し、サラシアが 2 型糖尿病における血糖調節の改善及び高脂肪食による糖・脂質代謝の改善に役立つことを期待している。

謝辞

本研究に際し、素晴らしいテーマをあたえていただくとともに、終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部食品機能学講座 和田政裕教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部食品機能学講座 真野博准教授に深謝の意を表します。

本学位論文の作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学薬学部薬物療法学講座 津田整教授並びに城西大学薬学部食毒性学講座 加園恵三教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、有益な助言並びにご激励賜りました城西大学薬学部生化学講座 白幡晶教授、城西大学薬学部衛生化学講座 川嶋洋一教授、城西大学薬学部衛生化学講座 工藤なをみ准教授、城西大学薬学部医療栄養学教育推進室 井口毅裕講師、城西大学薬学部医療栄養学教育推進室 和田牧子助手、城西大学薬学部食品機能学講座 清水純講師、城西大学薬学部予防栄養学講座 岩瀬靖彦教授、城西大学薬学部病態解析学講座 内田博之准教授、城西大学薬学部分子栄養学講座 千葉大成助教、城西大学薬学部細胞生理化学講座 高尾浩一助教、城西大学薬学部機能性食品科学講座 古旗賢二准教授、城西大学薬学部機能性食品科学講座 中谷祥恵助手、城西大学薬学部生化学講座 池口文彦准教授に深謝の意を表します。

実験遂行に際してご助言並びにご協力をいただきました城西大学薬学部食品機能学講座 および城西大学薬学部食品衛生学研究室の関連諸氏のご協力並びにご理解の下に本研究を遂行できましたことを感謝致します。

実験の部

第1章

第1節 サラシア幹熱水抽出液及びサラシア幹熱水抽出液凍結乾燥物の作製

① サラシアの鑑定

スリランカ原産サラシア・レティキュラータ（以下サラシア）幹はアーユルバーダコタラヒムブツ協会 (Tokyo, Japan) より供与された。植物体の鑑定は、スリランカ産業技術研究所ハーブ技術部門（Herbal Technology Section, Industrial Technology Institute, Colombo, Sri Lanka）G.A.S. Premakumara 博士が行った（Fig. 20）。

② サラシア幹熱水抽出液およびサラシア幹熱水抽出液凍結乾燥物の作製

サラシア幹（葉及び葉柄を取り除いた幹のみ）粉砕物を用いた。サラシア幹粉砕物 12 g を純水 1.5 L を用いて 90°C で 2 時間煮沸し、温時濾別後、濾液を $3000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、得られた上清をサラシア幹熱水抽出液 (SRE) とした。SRE を凍結乾燥 (Freeze Dryer System, Labconco, Kansas City, MO, USA) して得られた凍結乾燥物をサラシア幹熱水抽出液凍結乾燥物 (SRED) とした。SRE 1ml からは約 0.45 mg の SRED が得られた。

... Continuation Sheet

Authentication of a plant stem using TLC fingerprint analysis

Report No. CTS 4282

Name & Address of the client : Professor Masahiro Wada
Food Functional Science Laboratory
Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Jouzu University
1-1, Keyakida
Sakado, Saitama 350-0295
Japan

Specimen : *Salacia reticulata*
Description -
Colour - Reddish brown
Appearance - Wooden stem
Container - Polythene bag
Label - None

Date of receipt : 24.04.2007

Test requested : Identification of wood sample as a stem of Sri lankan medicinal plant *Salacia reticulata* as per client's letter.

Test method : Thin Layer Chromatography Analysis (TLC)
1. Methanol Extract
5 g of each sample was extracted into 50 ml of methanol, concentrated & spotted on a precoated TLC plate.

TLC parameters :
Plate - Silica gel GF₂₅₄ pre coated
Solvent system -
Hexane : Toluene : Acetone : Methanol
4 : 3.4 : 2 : 1

Spray reagent -
(i) Vanillin sulphate - Plate heated at 110°C for 10 min.
(ii) Anisaldehyde - Plate heated at 110°C for 10 min.

Page 03 of 04 pages

... Continuation Sheet

Report No. CTS 4282

2. Pot ether Extract
5 g of each sample was extracted into 50 ml of pot ether concentrated & spotted on a precoated TLC plate.

TLC parameters :
Plate - Silica gel GF₂₅₄ pre coated
Solvent system -
Chloroform : Hexane
08 : 02

Spray reagent -
Anisaldehyde - Plate heated at 110°C for 10 min.

Results :
TLC analysis indicates identical finger print pattern for the sample supplied to that of authentic stem extract of Sri Lankan medicinal plant *Salacia reticulata*.

Visualization: Anisaldehyde Vanillin-sulphuric Anisaldehyde

Extract - MeOH Extract - Pot ether

A B A B A B

A = Stem extract of authentic Sri Lankan medicinal plant *Salacia reticulata*
B = Stem extract of sample submitted by the client

Analysis was carried out by Ms. P. I. P. K. Fernando, Technical Officer.

Dr. G. A. S. Premakumara
Head
Herbal Technology Section
08.05.07
/lg

The report is limited specifically to the specimen/s submitted.

Page 04 of 04 pages

Figure 22. Identification of *Salacia reticulata*. The plants was identified by Dr. G.A.S. Premakumara, Herbal Technology Section, Industrial Technology Institute in Colombo, Sri Lanka.

Salacia reticulata (dried stems)

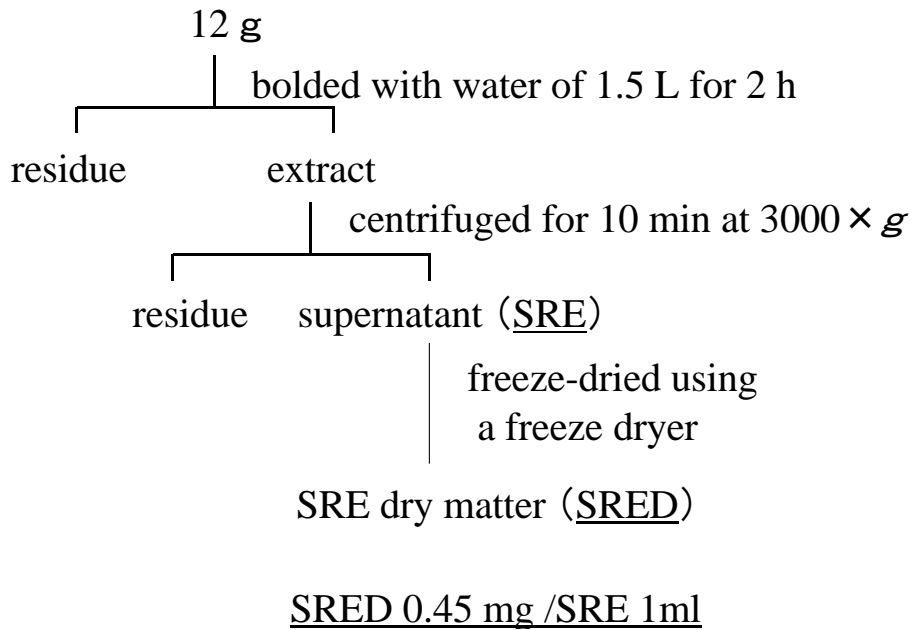


Figure 23. Preparation of SRE and SRED from the stems of *Salacia reticulata*.

第2節 実験動物と処置

① 実験動物と飼料

日本クレア社 (Tokyo, Japan) より購入した4週令の雄性 KK-Ay マウスを使用した。1週間の馴化飼育後、5週令から高脂肪飼料を摂取させた。高脂肪飼料は日本クレア社製クイックファット (粗脂肪=15.3%、脂肪エネルギー比=32.3%、425kcal/100g) を用いた。

室温 $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 12 時間 (明期 7:00-19:00) 環境で飼育し、7週年令からは単独飼育とした。動物実験は城西大学生命科学センター動物実験規範に従って行った。

② 実験飼育

糖尿病発症初期を想定しての検討 (空腹時血糖値 200mg/dl レベル)

5週令からの4週間、SRE、市販の桑茶抽出液 (KW) および純水を飲水として投与した (各群とも $n=6$)。飼料は自由摂取とした。実験飼育中は経時的に体重及び空腹時血糖値を測定した。実験飼育終了後、12時間の絶食後に頸椎脱臼法にて屠殺し、肝臓を摘出し、RT-PCR 法に供した。

糖尿病発症後期を想定しての検討 (空腹時血糖値 500mg/dl レベル)

8週令からの4週間、SRE、KW、塩酸メトホルミン (SIGMA) および純水を飲水として投与した (各群とも $n=6$)。実験飼育中は経時的に体重及び空腹時血糖値を測定した。実験飼育終了後 12 時間の絶食後に頸椎脱臼法にて屠殺し、肝臓を摘出し、DNA マイクロアレイ解析および RT-PCR 法に供した。

・桑茶抽出液

株式会社アムコより購入した市販の桑茶 (桑の葉及び葉柄の加工製造品) 20 g

を、純水 2L を用いて 30 分煮沸し、温時濾別した濾液を桑茶抽出液とした。

- ・ 塩酸メトホルミン (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride) (SIGMA 社製)

塩酸メトホルミンを純水に溶解し、1 日にマウス体重 1kg に対して 100 mg を投与した。

③ 空腹時血糖の測定

10 時間の絶食後に、マウスを捕縛器具で固定し尾静脈より血液を採取した。測定は、簡易血糖値測定器グルコカードダイアメーター (アークレイ株式会社製) を用いて行った。

第 3 節 DNA マイクロアレイ解析及び RT-PCR 法

① 試薬

total RNAの抽出およびRT-PCR法

TRIZOL Reagent、Super Script™ II RNase H⁻ Revers Transcriptase、DNase は invitrogen 社製を、Diethyl pyrocarbonate、Tris、EDTA は SIGMA 社製を使用した。Ex Tag ポリメラーゼ、Oligo (dT)、λ-EcoT141 digest、Φ×174 Hae III digest、Agarose LO3 は タカラバイオ株式会社製を使用した。dNTP Sequencing Greade Solution dNTP⁺ は Amersham Biosciences 社製を、ethidium bromide は GIBCO BRL 社製を用いた。その他の試薬は和光純薬の特級試薬を用いた。

DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社製の GeneChip Murine Genome U74A アレイ [82] を購入した。実験操作は、Invitrogen 社製 Life Technologies Super Script

Choice System (18090-019)、Affymetrix 社製 GeneChip Sample Cleanup Module、Affymetrix 社製 Enzo Bio Array High Yield RNA Transcript Labelling Kit を用いた。

② total RNA の抽出

total RNA の抽出は「manufacturer's instructions」に従って行った。4 週間の飼育終了後にマウスを 12 時間絶食させ、頸椎脱臼法にて屠殺後、肝臓を摘出した。0.05 g の肝臓を秤量後 2.0 ml Microcentrifuge Tube に採り TRIZOL Reagent 750 μ l とともにホモゲナイズ（マイクロテック・ニチオン PHYSCOTRON NS-350D (株)）した。各サンプルは、液体窒素で速やかに凍結し、実験時まで -80°C （SANYO URTRO LOW MDF-382）で保存した。total RNA の抽出は、TRIZOL Reagent 750 μ l を追加し、タンパク質を変性後、TRIZOL Reagent 試薬の 5 分の 1 容のクロロホルムで抽出し、水層を 1 容の 2-プロパノールで沈殿させた。沈殿物を 70 % エタノールで 3 回洗浄後、70% エタノールを取り除き DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 処理滅菌水に溶解した。total RNA 抽出液を UV (260 nm) 測定 (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV mini 1240 SHIMADU) し、RNA 濃度を求めた後 DEPC 処理滅菌水を用いて 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整した。

③ DNA マイクロアレイ解析

実験は、Affymetrix 社の「Protocol for GeneChip Expression Analysis」に従って行った。6 匹のマウスの肝臓から抽出した同量の total RNA を混和し、RNA 量として 10 μg を実験に共した。T7-(dT)₂₄プライマーで逆転写した後、「Invitrogen Superscript Choice System」を用いて 2 本鎖 cDNA を作製した。次に、ビオチンラベル化 cRNA を合成した後に断片化した。断片化 cRNA をハイブリダイゼーションした後、洗浄、

染色を施し、画像を Affymetrix 社の「Microarray Suite 5.0 software」を用いて解析した。Hierarchical clustering 解析は、「SpotFire DecisionSite7.1 Function Genome Programme」を用いた。

④ RT-PCR 法

total RNA 抽出液中に含まれている DNA を除去するため、DNase 処理を行った。次に、total RNA 抽出液 1 µg を Oligo (dT) 及び逆転写酵素 (Super Script[™] II RNase H⁻ Revers Transcriptase) で逆転写酵素反応法 (Reverse Transcriptase RT) を行い、cDNA を作製した。RT の条件は 50°C 60 min、99°C 3min で行った。Polymerase Chain Reaction (PCR) 反応は定法に従い Table 9 のプライマーと *Ex Taq* ポリメラーゼ (TAKARA) を用いて行った。

得られた PCR 産物を 1.5% アガロース (TAKARA) ゲルにて 100V で 20 分電気泳動 (Mupid ミニゲル泳動槽 (ADVANCE Co, Ltd)) し、エチジウムブロマイド溶液 (10 mg/ml) で、15 分染色した後、245 nm の紫外線照射下 (3 UV トランスルミネータ) でバンドを確認し、ポロライドカメラ Polapan 663 白黒インスタントパックフィルムを用いて、泳動画像を撮影した。泳動写真をフラッドヘッドスキャナーでデジタル画像化し、画像分析ソフト NIH-image を用いて数値化した。

⑤ 統計処理

統計処理はソフトウェアパッケージ SPSS version 9.0 for Windows (SPSS Japan Inc.) を用いて行った。2 群間の有意差検定は Student' t-test を用いた。検定は危険率 5% 未満を有意とした。

Table 10. PCR-primers

Gene		Sequence
GAPDH	forward	5' - TTG ACCTCAACTACATGG - 3'
	reverse	5' - ATGAGGTCCACCACCCTG - 3'
FBP1	forward	5' - GCAATGGCGAACCATGCG - 3'
	reverse	5' - TCACTTGGCTTTGTGCTT - 3'
G6P	forward	5' - GGATGTGGCTGAAAGTTTC - 3'
	reverse	5' - AACTCCCAGGACTGGTT - 3'
FBP2	forward	5' - ACAATGACGGACAGAAGC - 3'
	reverse	5' - TCAATTGACAAAGACAAAGG - 3'
UCP2	forward	5' - CCTGCATTGCAGATCTCATC - 3'
	reverse	5' - CTACAGAACAGGCCAGGGCA - 3'

第2章

第1節 マウス培養肝細胞株 IMH2 を用いた *in vitro* 実験系

① 試薬

Mangiferin (from *Mangifera indica* bark)、(-)-epicatechin、(-)-epigallocatechin は SIGMA 社製を用いた。CAS Registry Number は各々4773-96-0、490-46-0、970-74-1 である。

② 細胞培養

マウス培養肝細胞株は温度感受性突然変異株 SV40 TA g 遺伝子 (temperature-sensitive large T-antigen gene) を導入した H-2Kb-tsA58 トランスジェニックマウスより樹立された培養肝細胞株である IMH2 を用いた。細胞培地は ASF 培地 104 (Ajinomoto Helth Supply) を用い、5% Foetal Bovine Serum (FBS, GIBCO BRL)

を添加した。培養（増殖）は33℃ 5% CO₂の条件で、実験は37℃ 5% CO₂の条件で行った。継代は0.25% trypsin-0.02% EDTA solution (Sigma Aldrich) を用い、2～3 日毎に行った。

③ MTT Assay

IMH2 を 5×10^3 cells/well ずつ、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間後にSRED添加培地へ培地交換し、3 日間培養した。培地に添加したSRED 溶液はSREDをdimethyl sulphoxide (DMSO) に溶解後、0.20 μ m径フィルター (sartorius minisart RC15)で濾過滅菌したものを用いた。培養後、Cell Counting Kit-HS (DOJINDO) 試薬を培地の 1/10 量添加し、33℃ 5% CO₂ 存在下で2 時間静置し、プレートリーダー Wallac 1420ARVO.SX multilabel counter (WALLAC OY) を用いて、波長 450nmで測定した。各測定値は、溶媒のみを添加した測定値で除し、相対値を算出し比較した。

④ FBP mRNA 量の定量

IMH2 を 3×10^3 cells/well ずつ、60 mm細胞培養用ディッシュに播種し、72 時間後 80%コンフルントの細胞に、SRED溶液を添加した無血清培地（終濃度 1 μ g/ml）へ交換した。37℃ 5% CO₂ 存在下で 4 時間静置し、PBS溶液で洗浄後にTRIZOL Reagent試薬を用いてtotal RNAを抽出した。total RNA抽出液中に含まれているDNAを除去するため、DNase処理を行った。次に、total RNA抽出液 1 μ gをOligo (dT) 及び逆転写酵素で逆転写酵素反応法 (RT) を行い、c DNAを作製した。RTの条件は 50℃ 60 min、99℃ 3 min で行った。PCR反応は定法に従い以下のプライマーと *La Taq*ポリメラーゼ (TAKARA) を用いて行った。得られたPCR産物を 3.5%アガロース (nusieve GTG Agarose CAMBREX) ゲルにて 100Vで 20 分電気泳動 (Mupidミ

ニゲル泳動槽 (ADVANCE Co,Ltd) した後、上記と同様の操作を行いFBP mRNA量を解析した。

FBP forward 5'-AACGGATATCAGCACCCCTGAC-3'
reverse 5'-ACCATAGAGCTGTGCGATGC-3'

⑤ FBP 遺伝子発現量の調節機構

IMH2 を 3×10^3 cells/well ずつ、60 mm細胞培養用ディッシュに播種し、72 時間後 80%コンフルントの細胞にRNA合成阻害剤であるアクチノマイシンD (Act D, 終濃度 2.5 $\mu\text{g/ml}$) またはタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CFX, 終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$) を添加した無血清培地に交換し、37°C 5% CO₂ 存在下で 1 時間静置した。Act Dを作用させた細胞には、SRED (終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$) とAct D (終濃度 2.5 $\mu\text{g/ml}$) を、CHXを作用させた細胞にはSRED (終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$) とCHX (終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$) を、そしSRED (終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$) のみを添加した無血清培地に交換し 37°C 5% CO₂ 存在下で 4 時間静置した。total RNAの抽出、RT-PCR、電気泳動、エチジウムブロマ이드溶液による染色および画像解析は上記と同様の操作を行った。

⑥ 空腹時血糖値降下作用を有する機能性成分の検討

IMH2 を 3×10^3 cells/well ずつ、60 mm細胞培養用ディッシュに播種し、72 時間後 80%コンフルントの細胞にmangiferin (SIGMA), (-)-epicatechin (SGMA), (-)-epigallocatechin (SIGMA) (各々終濃度 $1 \times 10^{-10}\text{M}$) を添加した無血清培地に交換した後 37°C 5% CO₂ 存在下で 4 時間静置した。total RNAの抽出、RT-PCR、電気泳動、エチジウムブロマ이드溶液による染色、および画像解析は上記と同様の操作を行った。

IMH2 を 3×10^3 cells/well ずつ、60 mm細胞培養用ディッシュに播種し、72 時間後 80%コンフルントの細胞にmangiferin (終濃度 1×10^{-12} M $\sim 1 \times 10^{-9}$ M)を添加した無血清培地に交換した後 37℃ 5% CO₂ 存在下で 4 時間静置した。total RNAの抽出、RT-PCR、電気泳動、エチジウムブロマイド溶液による染色、および画像解析は上記と同様の操作を行った。

第2節 実験動物と処置

① 実験動物と飼料

日本クレア社 (Tokyo, Japan) より購入した 4 週令の雄性 KK-Ay マウスを使用し (各群 $n = 6$)。1 週間の馴化飼育後、5 週令から糖尿病を発症させる目的で、5 週間高脂肪飼料を摂取させた。高脂肪飼料は日本クレア社製クイックファットを用いた。飼料の摂取は自由摂取とした。

室温 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 12 時間 (明期 7:00-19:00) 環境で飼育し、7 週令からは単独飼育とした。動物実験は城西大学生命科学センター動物実験規範に従って行った。

② 実験飼育

10 週令からの 1 週間、1 日にマウス体重 1 kg に対して 5 mg (MG5 群) または 25 mg (MG25 群) の mangiferin (SIGMA) を純水に溶解して飲水として投与した。コントロール (C 群) としては、純水を投与した。実験飼育中は経時的に体重を測定した。実験飼育終了後に屠殺後、肝臓を摘出し、RT-PCR 法に供した。

③ 空腹時血糖値の測定

空腹時血糖値の測定は、投与開始 2 日目と 5 日目に行った。測定は、10 時間の絶食後に、マウスを捕縛器具で固定し尾静脈より血液を採取し、簡易血糖値測定器グルコカードダイアメーター（アークレイ株式会社製）を用いて行った。

④ RT-PCR 法

total RNA の抽出、RT-PCR、電気泳動、エチジウムブロマイド溶液による染色、および画像解析は第 1 章と同様の操作を行った。

第 3 章

第 1 節 間接的熱量測定法による酸素消費量および呼吸商の解析

① 実験動物と飼料

東京実験動物社 (Tokyo, Japan) より購入した 4 週令の雄性 C57BL/6J マウスを使用した。1 週間の馴化飼育後、5 週令から 4 群 (各群 $n=7$) に分けた。飼料は、AIN93G 飼料を基本組成とし、脂質含有量の異なる 2 種類の飼料 (普通食 N、高脂肪食 HF) を作製した。N の脂質含有量は 6% (w/w)、脂質エネルギー比は 13.8% で、HF の脂質含有量は 35% (w/w)、脂質エネルギー比は 53.0% であった。N 群および HF 群に 0.1% のサラシア幹熱水抽出液凍結乾燥物 (SRED) を添加した飼料を作製し、N+SRED および HF+SRED とした。マウスを 4 群 (N、N+SRED、HF、HF+SRED) に分け、各飼料を各々 9 週間摂取させた。飼料の詳細な組成を Table 13 に示した。

室温 $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 12 時間 (明期 7:00-19:00) 環境で飼育した。動物実験は城西大学生命科学センター動物実験規範に従って行った。

Table 13. Composition of Experimental Diets

Ingredients	N	N+SRED	HF	HF+SRED
		<i>g/kg</i>		
Casein	200	200	200	200
Sucrose	650	649	357	356
Cellulose powder	40	40	40	40
Corn oil	9	9	50	50
Lard	51	51	300	300
Vitamin mixture ^{a)}	10	10	10	10
Mineral mixture ^{b)}	35	35	35	35
Choline chloride	2	2	2	2
DL-Methionine	3	3	3	3
SRED	—	1	—	1
Energy, <i>kJ/g</i>	16.5	16.5	22.5	22.5
Fat, % of energy	13.8	13.8	53.0	53.0

SRED: freeze-dried aqueous extract from the stem of *Salacia reticulata*. a) Vitamin mixture: composition of AIN-93-VX. b) Mineral mixture: composition of AIN-93G-MX.

② 酸素消費量 (VO₂) および呼吸商 (RQ) の解析

給餌開始は 19:00 とし、毎日飼料摂取量を測定した。体重は経時的に測定した。実験飼料の給餌を開始して 6 週間目から、小動物用代謝測定システム (MK-5000RQ、Muromachi) 用いて呼気中の気体組成を測定し、VO₂及びRQを解析した。呼気の測定は給餌後 19:00 から、暗期 (19:00-07:00)、明期 (7:00-19:00) の 12 時間サイクルで 24 時間行った。小動物用代謝測定器は流速 400 ml/min に設定し測定は 3 分毎に行った。普通食群 (N、N+SRED)、高脂肪食群 (HF、HF+SRED) 各々 3 回ずつ測定を行い、VO₂及びRQの平均値を算出した。

実験飼育終了後、ジエチルエーテル麻酔下で大静脈より血液を採取後、肝臓、睾丸周囲白色脂肪組織、腎周囲白色脂肪組織、褐色脂肪組織を摘出し、肝臓および白色脂

肪組織重量を測定した。

③ 血中パラメーターの定量

採取した血液はプラスチックチューブに入れ 30 分間室温で放置した後、遠心分離 ($6000 \times g$ 、 4°C 、30 min) により血清を得た。血清中のグルコース濃度はグルコース C2-テストワコー (和光純薬 (株))、トリグリセリド濃度は TG E-テストワコー (和光純薬 (株))、遊離脂肪酸濃度は NEFA C-テストワコー分析キット (和光純薬 (株))、インスリン濃度はマウスインスリン ELISA kit (Shibayagi)を用いて定量した。

④ 脂肪細胞サイズの測定

褐色脂肪組織細胞および睪丸周囲白色脂肪組織細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、オイルレッド O 溶液で染色した。染色は、各サンプルを純水で洗浄(30 秒)し、60%イソプロパノールを浸透 (1 分) させ、オイルレッド O 染色液で染色 (37°C 15 分) 後、60%イソプロパノールで分別 (2 分) し、純水で洗浄 (3 分) した。細胞の写真は、OPIMPUS SC35 TYPE12 を用いて撮影した。脂肪細胞の直径をスケールで測定後、平均値を算出した。

⑤ 統計処理

統計処理はソフトウェアパッケージSPSS version 9.0 for Windows (SPSS Japan Inc.) を用いて行った。実験によって得られた数値は平均値 \pm SDで示した。2 群間の有意差検定はStudent t-testを用いた。検定は危険率 5%未満を有意とした。有意差検定は一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Tukey's least significant test により多重検定比較を行った。

第4章

第1節 実験動物と処置

① 実験動物と飼料

東京実験動物社より購入した4週令の雄性C57BL/6Jマウスを使用した(各群 $n=6$)。1週間の馴化飼育後、5週令から2群に分け、サラシア幹熱水抽出液(SRE)および純水(Control)を飲水として3週間投与した。飼料は、実験動物用固形飼料MF(オリエント酵母工業(株))を自由摂取させた。

室温 $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗サイクル12時間(明期 7:00-19:00 暗期 19:00-7:00)環境飼育した。動物実験は城西大学生命科学センター動物実験規範に従って行った。

② 実験飼育

体重は経時的に測定した。SREの投与を開始して2週間目に糖負荷試験(OGTT, Oral Glucose Tolerance Test)を行った。糖負荷試験は16時間の絶食後、SREまたは純水を200 μl 経口投与した後に、体重1 kg 当り2 gのグルコース(和光純薬(株))を経口投与した。グルコースは、純水に溶解し20% 溶液とし、200 μl を投与量とした。投与前、投与後30分、60分、120分に尾静脈より血液を採取し、簡易血糖値測定器グルコカードダイアメーター(アークレイ株式会社製)を用いて血糖値を測定した。

実験飼育終了後、ジエチルエーテル麻酔科で大静脈より血液を採取後、肝臓を摘出し、肝臓重量を測定後DNAマイクロアレイ解析に供した。

③ 血中パラメーターの定量

採取した血液はプラスチックチューブに入れ 30 分間室温で放置した後、遠心分離 ($6000 \times g$, 4°C , 30 min) により血漿を得た。血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性とアラニンアミノトランスフェラーゼ活性は、Transamylase C-II テストワークキット (和光純薬 (株)) を用いて測定した。

第2節 DNA マイクロアレイ解析

① 試薬

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社製の GeneChip Murine Genome U74A アレイを購入した。実験操作は、Invitrogen 社製 Life Technologies Super Script Choice System (18090-019)、Affymetrix 社製 GeneChip Sample Cleanup Module、Affymetrix 社製 Enzo Bio Array High Yield RNA Transcript Labelling Kit を用いた。

② total RNA の抽出

total RNA の抽出は「manufacturer's instructions」に従って行った。3 週間の飼育終了後にマウスを 12 時間絶食させ、頸椎脱臼法にて屠殺後、肝臓を摘出した。肝臓 0.05g を秤量後 2.0 ml Microcentrifuge Tube に採り TRIZOL Reagent 750 μl とともにホモゲナイズ (マイクロテック・ニチオン PHYSCOTRON NS-350D (株)) した。total RNA 抽出時に TRIZOL Reagent 750 μl を加えた。total RNA の抽出および定量は、第 1 章と同様の操作を行った。

③ DNA マイクロアレイ解析

実験は、Affymetrix社の「Protocol for GeneChip Expression Analysis」に従って行った。6匹のマウスの肝臓から抽出した同量のtotal RNAを混和し、RNA量として 10 µgを実験に共した。T7-(dT)₂₄プライマーで逆転写した後、「Invitrogen Superscript Choice System」を用いて2本鎖cDNAを作製した。次に、ビオチンラベル化cRNAを合成した後に断片化した。断片化cRNAをハイブリダイゼーションした後、洗浄、染色を施し、画像をAffymetrix社の「Microarray Suite 5.0 software」を用いて解析した。「Microarray Suite 5.0 software」の解析結果を基に、「National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID)」 「Database for Annotation, Visualization, an Integrated Discovery (DAVID)」の「Expression analysis systemic explorer (EASE)」による統計解析を行った。解析結果の「EASE score」は $p < 0.05$ を有意差とした。

引用文献

- [1] Moller D.E. (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **414**, 821-827.
- [2] 平成 18 年人口動態統計 厚生労働省
- [3] 平成 18 年国民健康・栄養調査 厚生労働省
- [4] Dove A. (2002) Seeking relief for diabetes. *Nat. Biotechnol.* **20**, 977 - 981.
- [5] Mathis D. (2001) β -cell death during progression to diabetes. *Nature* **414**, 792 - 797.
- [6] Zimmerp P. and Alberti K.G (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782 - 787.
- [7] Saltiel A.R. and Kahn C.R. (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799 - 805.
- [8] Swinbanks D. and O'Brien J. (1993) Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature* **364**, 180 .
- [9] Arai S., Morinaga Y., Yoshikawa T., Ichiishi E., Kiso Y., Yamazaki M., Morotomi M., Shimizu M., Kuwata T. and Kamigawa S. (2002) Recent trends in functional food science and the industry in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2017-2029 .
- [10] Warrir P.K. and Nambir V.P.K. and Ramankutty C. (1993) Indian medicinal plants. Orient Longman, Chennai, pp.47-48.
- [11] Jayawardena. M., Alwis N.M.W., Hettigoda V. and Fernondo D.J.S. (2005) A double blind randomized placebo controlled cross over study of a herbal preparation containing *Salacia reticulata* in the treatment of type 2 diabetes. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 215-218 .
- [12] Serasinghe S. (1990) Oral hypoglycemic effect of *Salacia reticulata* in the streptozotocin induced diabetic rat. *Phytother. Res.* **4**, 205-206.

- [13] Shimoda H. Kawamori S. and Kawahara Y. (1998) Effect of an aqueous extract of *Salacia reticulata*, a useful plant in Sri Lanka, on postprandial hyperglycemia in rats and humans. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **51**, 279-286 .
- [14] Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G and Muraoka O. (1997) Salasinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India. *Tetrahedron Lett* **38**, 8367-8370 .
- [15] Yoshikawam M., Murakami T., Yashiro K., and Matsuda H. (1998) Kotalanol, a potent α -glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic ayurvedic medicine *Salacia reticulata*. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 1339-1340.
- [16] Karunanayake E.H., Welihinda J., Sirimanne S.R. and Sinnadorai G (1984) Oral hypoglycaemic activity of some medicinal plants of Sri Lanka. *J. Ethnopharmacol.* **11**, 1339-1340.
- [17] Kajimoto O., Kawamiri S., Shimoda H., Kawahara Y., Hirata H., anf Takahashi T. (2000) Effect of a diet containing *Salacia reticulata* on mild type 2 diabetes in humans. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **53**, 199-205.
- [18] Stein S., Liehr T., and Eschrich K. (2001) Characterization of the mouse liver fructose-1,6-bisphosphatase gene. *Gene* **264**, 215-224.
- [19] Aoki S., Kikuchi T. Mukasa K., Ito S., Nakajima A., Satoh S., Okamura A. and Sekihara H. (1999) Dehydroepiandrosterone suppresses the elevated hepatic glucose-6- phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activities in C57BL/Ksj- db/db mice: comparison with troglitazone. *Diabetes* **48**, 1579-1585.

- [20] Sun Y, Liu S., Ferguson S., Wang L., Klepcyk P., Yun J.S., and Friedman J.E. (2002) Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 23301-23307.
- [21] Kiarzstan A., Modzelewska A., Jarzyna R., Jagielska E., and Bryla J (2002) Inhibition of gluconeogenesis by vanadium and metformin in kidney-cortex tubules isolated from control and diabetic rabbits. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 1371-1382.
- [22] Wong H., Anderson W.D., Sheng T. and Riabowol K.T. (1994) Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: The “primer-dropping” method. *Analytical Biochemistry* **223**, 251-258.
- [23] DeRisi J.L. and Iyer V.R. and Brown P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686.
- [24] Okazaki m., Saito Y., Uda Y., Maruyama M., Murakami H., Ota S., Kikuchi. T. and Oguchi K. (2002) Diabetic nephropathy in KK and KK-Ay mice *Experimental Animals*, **51**, 191-196.
- [25] Im R., Mano H., Nakatani S., Shimizu J. and Wada M. Mechanisms of blood glucose-lowering effect of aqueous extract from stems of Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) in the mouse. *J Ethnopharmacol*, Accepted.
- [26] Nakagawa. K, Kubota H. Kimura T. Yamashita S., Tsuzuki T. Oikawa S. and Miyazawa T. (2007) Occurrence of orally administered mulberry 1-deoxynojirimycin in rat plasma. *J. Agric Food Chem.* **55**, 8928-8933.
- [27] Kimura, T. (2007) Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5869-5874.
- [28] Kwon M.J. and Lee S.Y. (2008) Evaluation of glucocard x-meter glucose monitoring system. *Korean J. Lab. Med.* **28**, 8-15.
- [29] DeFronzo, R.A. (1999) Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*

131, 281-303.

- [30] Bailey, C.J. (1992) Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* **15**, 755-772.
- [31] Kaushal D. and Naeve C.W. (2004) Analyzing and visualizing expression data with spotfire. *Curr. Protoc. Bioinformatics* **7**, 7-9.
- [32] Matsuura, T. Kawada M., Hasumura S., Nagamori S., Obata T., Yamaguchi M., Hataba Y., Tanaka H., Shimizu H., Uemura Y., Nonaka K., Iwaki T., Kojima S., Aizaki H., Mizutani S. and Ikenaga H. (1998) High density culture of immortalized liver endothelial cells in the radial-flow bioreactor in the development of an artificial liver. *Int. J. Artif. Organs* **21**, 229-234.
- [33] Yoshikawa M., Nishida N., Shimoda H., Takada M., Kawahara Y. and Matsuda H. (2001) Polyphenol constituents from *Salacia* species: quantitative analysis of mangiferin with α glucosidase and aldose reductase inhibitory activities. *YAKUGAKU ZASSHI* **121**, 371-378.
- [34] Yoshikawa M. Shimoda H., Nishida N. and Takada M. (2002) *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. *J. Nutr.* **132**, 1819-1824.
- [35] Yoshikawa M. Ninomiya K., Shimoda H., Nishida H. and Matsuda H. (2002) Hepatoprotective and antioxidative properties of *Salacia reticulata* : preventive effects of phenolic constituents on CCl₄-induced liver injury in mice. *Biol Pharm Bull.* **25**, 72-76.
- [36] Kato S., Mano H., Kumazawa T. Yoshizawa Y., Kojima R. and Masushige S. (1992) Effect of retinoid status on α , β and γ retinoid acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem. J.* **286**, 755-760.
- [37] Mano H., Mori R., Ozawa T., Takeyama K., Yoshikawa Y., Kojima R., Arao Y., Masushige S and Kato S. (1994) positive and negative regulation of retinoid X receptor gene expression by thyroid hormone in the rat. *J. Biol. Chem.* **269**, 1591-1594.
- [38] Katsurada A., Fukuda H., Iritani N. Matsumura Y., Nishimoto N., Noguchi T. and Tanaka T.

- (1990) Effect of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver. *Eur. J. Biochem.* **190**, 435-451.
- [39] Katsurada A., Iritani N., Fukuda H., Noguchi T. and Tanaka T. (1990) Influence of diet on the transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme induction in the rat liver. *Eur. J. Biochem.* **168**, 487-491.
- [40] Wang Y., Hacker A., Murray-Stewart T., Fleischer J.G., Woster, P.M. and Casero R.A.Jr. (2005). Induction of human spermine oxidase SMO (PAOh1) is regulated at the levels of new mRNA synthesis, mRNA stabilization and newly synthesized protein. *Biochem. J.* **386**, 543-547.
- [41] Li X.L., Andersen J.B., Ezelle H.J., Wilson G.M., and Hassel B.A. (2007) Post-transcriptional regulation of RNase-E expression is mediated by the 3' untranslated region of its mRNA. *J. Biol. Chem.* **282**, 7950-7960.
- [42] Aritomi M., and Kawasaki T. (1996) A new xanthone C-glucoside, position isomer of mangiferin, from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Tetrahedron Lett.* **12**, 941-944.
- [43] Rodriguez J., Di Pirro D., Gioia M., Monaco S., Delgado R., Coletta M., and Marini, S. (2006) Effects of a natural extract from *Mangifera indica* L, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1760**, 1333-1342.
- [44] Ichiki H., Miura T., Kubo M., Ishihara E., Komatsu Y., Tanigawa K. and Okada M. (1998) New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 1389-1390.
- [45] Guha S., Ghosal S., and Chattopadhyay U. (1996) Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effects of mangiferin, a naturally occurring glucosyloxanthone. *Chemotherapy* **42**, 443-451.
- [46] Yoshimi N., Matsunaga K., Katayama, M., Yamada Y., Kuno T., Oiao Z., Hara A., Yamahara J., and Mori H. (2001) The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring

- glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats. *Cancer Lett.* **163**, 163-170.
- [47] Sanchez G.M., Re L., Giuliani A., Nunes-Selles, A.J., Davison G.P. and Leon-Oernandez O.S. (2000) Protective effects of *Mangifera indica* L. extracts, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced bioleules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol. Res.* **42**, 565-573.
- [48] Muruganandan K., Srinivasan K., Gupta S., Gupta P.K., and Lal J. (2005) Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 497-501.
- [49] Ichiki H., Miura T., Kubo M., Ishihara E., Komatsu Y., Tanigawa K., and Okada M. (1998) New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 1389-1390.
- [50] Kishino E., Ito T., Fujita K. and Kiuch Y. (2005) A mixture of *Salacia reticulata* (Kothala himbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces the accumulation of visceral fat mass in mice and rats with high-fat diet-induced obesity. *J. Nutr.* **136**, 433-439.
- [51] Lindmark L and Lundholm A. (1986) A method for measuring energy metabolism and whole body oxidation in small animals with special reference to experimental metabolism and nutrition. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **46**, 273-281.
- [52] Im R., Mano H., Nakatani S., Shimizu J. and Wada M. Aqueous extract of Kothala himbutu (*Salacia reticulata*) stems promotes oxygen consumption and suppresses body fat accumulation in mice. *J. Health Sci.* In press.
- [53] Ramirez-Zacarias J., Castro-Munozledo F. and Kuri-Harcuch W. (1992) Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intercytoplasmic lipids with Oil Red O. *Histochemistry* **97**, 493-497.
- [54] Im R., Mano H., Nakatani S., Shimizu J. and Wada M. Safety evaluation of the aqueous extract Kothala Himbutu (*Salacia reticulata*) stems in the hepatic gene expression profile of

normal mice using DNA microarrays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, In press.

- [55] Ounuki K., Haramizu S., Oki K., Watanabe T., Yazawa S. and Fushuki T. (2001) Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2735-2740.
- [56] Murase T., Haramizu S., Shimotoyodome A. and Tokimitsu I. (2006) Reduction of diet-induced obesity by a combination of tea-catechin intake and regular swimming. *Int. J. Obes.* **30**, 561-568.
- [57] Nedergaard J., Golozoubova V., Matthias A., Asadi A., Jacobsson A. and Cannon B. (2001) UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* **1504**, 82-106.
- [58] Holm C. (2003) Molecular mechanisms regulation hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1120-1124.
- [59] Petzke K.J., Riese C. and Llaus S. (2007) Short-term, increasing dietary protein and fat moderately affect energy expenditure, substrate oxidation and uncoupling protein gene expression in rats. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 400-407.
- [60] Klaus S., Pultz S., Thone-Reineke C. and Wolfram S. (2005) Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int. J. Obes.* **29**, 615-623.
- [61] Srivastava R.A., Jahagirdar R., Azhar S. and Bisgaier C.L. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha selective ligand reduces adiposity, improves insulin sensitivity and inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Mol. Cell. Biochem.* **285**, 35-50.
- [62] Huang T.H.W., Peng G, Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D. and Li T. (2006) *Salacia oblonga* root improves postprandial hyperlipidemia and hepatic steatosis in Zucker diabetic

- fatty rats: Activation of PPAR- α . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **210**, 225-235.
- [63] Susanne K., Marina E., Dag E. and Gerhard H. (1995) Functional assessment of white and brown adipocyte development and energy metabolism in cell culture. *J. Cell Sci.* **108**, 3171-3180.
- [64] Catalano P.M. (2003) Obesity and pregnancy: the propagation of a viscous cycle Editorial? *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **88**, 3505-3506.
- [65] Jernas M., Palming L., Sjolm K., Jennische E., Svensson P.A., Gabrielsson B.G, Levin M., Sjogren A., Rudemo M., Lystig T.C., Carlsson B., Carlsson L.M.S. and Lonn M. (2006) Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J.* **20**, E832-E839.
- [66] Kubota N., Terauchi Y., Kubota T., Kumagai H., Itoh S., Satoh H., Yano W., Ogata H., Tokuyama K., Takamoto L., Mineyama T., Ishikawa M., Moroi M., Sugi K., Yamauchi T., Ueki K., Tobe K., Noda T., Nagai R. and Kadowaki T. (2006) Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* **281**, 8748-8755.
- [67] Li, Y. Huang T.H. and Yamahara J. (2008) Salacia root, a unique Ayurvedic medicine, meets multiple targets in diabetes and obesity. *Life Science*, **82**, 1045-1049.
- [68] DennisG Jr., Sherman B.T., Hosack D., Yang J., Gao W. Lane H.C. and Lempicki R.A. (2003) DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol*, **4**, P3.
- [69] Hosake D. A., nnis G Jr., Sherman B.T., Lane H.C. and Lempicki R.A. (2003) identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* **4**, R70.
- [70] Arrai S. (1996) Studies on functional foods in Japan-state of the art. *Biosci. Biotechnol.*

Biochem. **60**, 9-15.

- [71] Muller M. (2003) Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev Genet* **4**, 315-322 (2003).
- [72] Nrasaka S. endo Y., Fu Z., Moriyama M., Arai S., Abe K. and Kato H. (2006) Safety evaluation of hypoallergenic wheat flour by using a DNA microarray. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1464-1470.
- [73] Kamakura M. Kamakura M., Maebuchi M., Ozasa S., Komori M., Ogawa T., Sakaki T. and Moriyama T. (2005) Influence of royal jelly on mouse hepatic gene expression and safety assessment with a DNA microarray. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **51**, 148-155.
- [74] Shimoda H. (2001) Thirteen-week repeat dose oral toxicity study of *Salacia reticulata* extract in rats. *Japanese Journal of Medicine and Pharmaceutical Science* **46**, 527-540.
- [75] Shimoda H. (2001) Antigenicity and Phototoxicity of Water-soluble Extract from *Salacia reticulata* (Celastraceae). *Japanese Journal of Hygiene*, **42**, 144-147.
- [76] Lynch T. (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am. Fam. Physician.* **76**, 391-396 .
- [77] Faber M. S. (2005) Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **97**, 125-134.
- [78] Mei N. Guo L., Zhang L., Shi L., Sun Y.A., Fung C., Moland C.L., Dial S.L., Fuscoe J.C. and Chen T. (2006) Analysis of gene expression changes in relation to toxicity and tumorigenesis in the livers of Big Blue transgenic rats fed comfrey (*Symphytum officinale*). *BMC Bioinformatics* **7**, S16.
- [79] Gue L., Mei N., Dial S., Fuscoe J. and Chen T. (2007) Comparison of gene expression profiles altered by comfrey and riddelliine in rat liver. *BMC Bioinformatics* **8**, S22.
- [80] Stadlbauer V., Fickert P., Lankner C., Schmerlaib J., Krisper P., Trauner M. and Stauber R.E. (2005) Hepatotoxicity of NONI juice: Report of two cases. *World J. Gastroenterol.* **14**,

4758-4760.

- [81] Whiting W., Thomsen M. and Sali A. (2004) Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *Med. J. Australia*. **180**, 598-600.
- [82] Kume E., Aruga C., Ishizaka Y., Takahashi K., Miwa S., Itoh M., Fujimura H., Toriumi W., Kitamura K. and Doki K. (2005) Gene expression profiling in streptozotocin treated mouse liver using DNA microarray. *Exp. Toxicol. Pathol.* **56**, 235-244.